N° d'ordre : 2006-37 Année 2006

École Centrale de Lyon
École Doctorale Chimie, Procédés, Environnement

THÈSE
pour obtenir le grade de
Docteur
de l'École Centrale de Lyon

présentée et soutenue publiquement par

Mouna MARRAKCHI

le 15 décembre 2006

Développement et optimisation de biocapteurs à base de biomolécules et de micro-organismes sur microélectrodes interdigitées

préparée au sein du laboratoire CEGELY

sous la direction de
Mme Nicole JAFFREZIC-RENAULT
M. Claude MARTELET

COMPOSITION DU JURY

M. Didier LEONARD	Président	(Professeur, UCBL, Lyon)
M. Serge COSNIER	Rapporteur	(Professeur, Université Joseph Fourier, Grenoble)
Mme Marie-Claire LETT	Rapporteur	(Professeur, Université Louis-Pasteur, Strasbourg)
Mme Florence LAGARDE	Examinateur	(Chargée de recherche CNRS, UCBL, Lyon)
Mme Nicole JAFFREZIC-RENAULT	Directrice de thèse	(Directeur de recherche CNRS, ECL, Lyon)
M. Claude MARTELET	Co-directeur de thèse	(Professeur, ECL, Lyon)

À la mémoire de mes grands-pères
Deux personnalités exceptionnelles

Remerciements

Même si une thèse est à la base un travail personnel c'est aussi le fruit d'une aventure collective. Je me dois de remercier tout ceux qui y ont participé.

Je tiens à remercier en tout premier lieu Nicole Jaffrézic-Renault pour avoir encadré mon travail depuis le D.E.A et pendant ces années de thèse. Ce travail n'aurait pas vu le jour sans sa confiance et sa générosité. Je voudrai par ailleurs lui exprimer ma gratitude pour la rigueur scientifique dont elle a toujours fait preuve ainsi que pour ses qualités humaines et son soutien permanent même pendant les moments les plus difficiles.

Je voudrais aussi remercier Claude Martelet pour avoir co-encadré ce travail avec dévouement et disponibilité. Je lui suis reconnaissante pour tout les conseils judicieux et les remarques pertinentes qu'il m'a prodigués.

Cette thèse à été entamée au laboratoire IFoS dirigé par Daniel Tréheux puis continué au laboratoire CEGELY de l'école Centrale de Lyon dirigé par Laurent Nicolas. Je les remercie sincèrement de m'avoir accueilli dans leurs laboratoires respectifs.

Je remercie également Serge Cosnier, Professeur à l'université Joseph Fourier de Grenoble et Marie-Claire Lett, Professeur à l'Université Louis Pasteur de Strasbourg pour m'avoir fait l'honneur d'examiner ce travail et d'en être les rapporteurs.

Je tiens aussi à remercier sincèrement les autres membres du jury Didier Léonard, Professeur à l'Université Claude Bernard de Lyon et Florence Lagarde, Chargée de recherche CNRS à l'Université Claude Bernard de Lyon.

Pendant ces trois ans, j'ai eu également le plaisir de collaborer avec plusieurs laboratoires : le laboratoire de Neurobiologie de l'Olfaction et de la Prise Alimentaire, Récepteurs et Communication Chimique, de l'INRA à Jouy-en-Josas : merci à Edith Pajot et Jasmina Minic pour leurs disponibilités, leurs conseils et leurs aides précieuses ; le laboratoire de génétique moléculaire, génomique, microbiologie de l'Université Louis-Pasteur duquel je voudrais remercier spécialement Marie-Claire Lett et Didier Lièvremont pour les fructueuses discussions et les remarques pertinentes que nous avons partagé. Je remercie également à Philippe Namour du Cemagref de Lyon pour les analyses de l'eau par les méthodes classiques.

Un merci spécial à Sergei qui m'a initié au monde des biocapteurs conductimétriques avec pédagogie et patience. Je le remercie chaleureusement ainsi que Valentina et tout les autres amis Ukrainiens : Slava, Alexey, Iryna pour tout les supers moments que nous avons passé ensemble.

Je n'oublierai pas de remercier tout les membres du laboratoire CEGELY en particulier Ricardo, Josiane, Philippe, Gilles, Daniel, Alice, Hélène pour leur gentillesse et leur aide. Un grand merci aussi à Monique pour sa patience, sa gentillesse et sa disponibilité. Sans son efficacité, le travail au laboratoire n'aurait pas été dans les mêmes conditions.

Je voudrais par ailleurs remercier tout mes amis thésards : Walid, Rita, Iryna, Lotfi, Yanxia, Saloua, Chaker, Houcine, Amira, Basma, Graziella, Mohsen, Jihède, Messaoud ainsi que Christelle et Rodica.

Je garderai toujours un excellent souvenir des moments passés au batiment D4 de l'Ecole Centrale avec les adorables Dominique, Rita, Anne-Gaëlle, Raquel, Denise, Anne-Laure et toute la compagnie. Merci d'avoir été là.

Je ne pourrais pas parler de mon aventure Lyonnaise sans parler des amis qui ont beaucoup compté pour moi :

- mes compagnons de route Boulbaba, Riadh, Fadoua, Emna, Rima, Kaouther, les deux Sana, Anis, Gaddour, Sonia, Meriem ; je n'oublierai jamais les fous rires qu'on a eu ensemble ni la chaleur des moments qu'on a partagé ; merci d'avoir toujours été là pour moi ; un merci spécial à Boulbaba et Riadh mes génies informaticiens pour leur patience et leur aide précieuse pour mes problèmes informatiques et à Riadh qui m'a si gentiment initié au monde du Latex et sans qui ce rapport n'aurait pas eu cette forme.
- mes amis Khaled, Yassmine, Sana, les deux Melek, Rima, Sabrina, Amine, Salma, Nejmeddine, Haykel ; merci pour les bons moments que nous avons passé ensemble, je m'en souviendrai toujours.
- mon ami Nicolas pour les soirées tardives pendant lesquelles les expérimentations me retenaient au laboratoire, et à la fin desquelles il m'a gentiment raccompagné, je le remercie pour sa gentillesse, sa disponibilité et son amitié.

Je voudrais également remercier mon oncle Ghanem qui a toujours cru en moi et qui m'a soutenu ainsi que Mohsen, Yosra, Rim et Rami qui ont été là pour moi lors de mes séjours Parisiens. Merci aussi à ma cousine Myriam qui m'a particulièrement soutenue pendant la dernière ligne droite de la rédaction de cette thèse.

Je ne pourrai pas parler de ma thèse à Lyon sans penser à ma "seconde famille", la famille Chaabouni qui a toujours été là pour m'épauler, me soutenir et m'entourer de son affection. Merci à ma tante Aida et mon oncle Rachid pour leur gentillesse, leur générosité et tout les sacrifices qu'ils ont fait pour moi. Les mots me manquent pour leur exprimer toute ma gratitude.

Un merci particulier pour mon fiancé Tarek qui a toujours été là pour me soutenir, même dans les moments les plus difficiles et m'apaiser comme lui seul sait le faire ainsi qu'à mes beaux-parents et Melek et Slim pour leur gentillesse et leur affection.

Finalement, je voudrais remercier ma tendre famille : mes deux adorables frères Walid et Sami pour leur soutien permanent et leur affection ; ma belle-sœur Miryam pour sa gentillesse et sa joie de vivre. **Une pensée spéciale pour mes parents sans qui je n'aurais pas été ce que je suis aujourd'hui. Ils ont toujours su m'inculquer la valeur de la science, m'ont supporté inconditionnellement pendant toutes mes études et ont fait beaucoup de sacrifices pour moi. Que cette thèse leur soit dédié avec toute mon affection.**

Lyon, le 09 novembre 2006 Mouna Marrakchi

Résumé

De nos jours, les besoins en biocapteurs dans différents domaines (environnement, médical...) sont réels. Et c'est pour répondre à certains de ces besoins que dans ce travail nous nous sommes intéressés au développement de différents biocapteurs se basant sur l'immobilisation d'enzymes et/ou de micro-organismes sur des électrodes conductimètriques.

La première partie de ce travail a été consacrée au développement d'un biocapteur enzymatique à base de proteinase K pour le contrôle de la pollution organique dans les eaux naturelles à travers le dosage des protéines. Dans la partie suivante, nous nous sommes intéressés au développement d'un biocapteur associant deux activité enzymatique : la β-galactosidase et la glucose oxydase et son application au dosage du lactose dans le lait. La réussite du suivi de la catalyse du lactose par la combinaison de son hydrolyse enzymatique par la β-galactosidase avec l'oxydation, du glucose généré (catalysée par la glucose oxydase), à l'aide des électrodes conductimètriques, ont ensuite été appliqués au dosage du sélénite (élément toxique à forte dose). Ceci a été réalisé en exploitant la β-gal induite dans les cellules bactériennes de *Herminiimonas arsenicoxydans* par la présence de sélénite. Ainsi, un biocapteur conductimètrique original associant la glucose oxydase à une bactérie génétiquement modifiée, qui exprime l'activité β-galactosidase en présence de sélénite, a été développé pour la détermination du sélénite. Enfin, un biocapteur olfactif se basant sur l'immobilisation de levures *S. Cerevisiae* génétiquement modifiées, exprimant le récepteur olfactif humain OR17-40 a été développé et appliqué avec succès à la détection de l'hélional.

Mots-clés : biocapteurs, électrodes conductimètriques, protéinase K, glucose oxydase, béta-galactosidase, *Herminiimonas arsenicoxydans*, *Saccharomyces Cerevisiæ*, protéines, pollution organique, lactose, sélénium, récepteur olfactif, hélional.

Abstract

Nowadays, the needs in biosensors has proven to be real and relevant in several fields such as the environment, health,... To meet those needs and expectations, we focused in this thesis on the design of different biosensors based on enzyme and/or micro-organisms immobilized on conductometric electrodes. The first part of this study is dedicated to the use of proteinase K based biosensor to estimate and control organic pollution in river's waters through protein titration. The next part describes the development of a biosensor mixing two distinct enzymatic activities, the beta-galactosidase and the glucose oxidase, and its application to lactose determination in milk. The efficiency of the conductometric biosensor in lactose analysis, as a result of combination of lactose enzymatic hydrolysis (though beta-galactosidase) and glucose oxidation (catalyzed by glucose oxidase), were afterwards applied to selenite determination (toxic element if used in important quantities). This was realized by using *Herminiimonas arsenicoxydans* bacterial cells where the beta-galactosidase activity is induced by selenite. Thus, an original conductometric biosensor has been developed, based on the combination of glucose oxidase activity and genetically modified bacteria, which produced a beta-galactosidase activity in presence of selenite. Finally, an olfactory biosensor based on the immobilization of a genetically modified *Saccharomyces Cerevisiæ* yeast, expressing the human olfactory receptor OR17-40, has been successfully developed and applied to helional detection.

Keywords : biosensors, conductometric electrodes, proteinase K, glucose oxidase, beta-galactosidase, *Herminiimonas arsenicoxydans*, *Saccharomyces Cerevisiæ*, proteins, organic pollution, lactose, selenium, olfactory receptor, helional.

Introduction générale

L'évolution de la demande et de la nécessité dans des situations nombreuses, de donner une information en temps reel, pour faire face à un événement critique, a motivé la recherche de méthodes alternatives. Parmi ces méthodes et les dispositifs qui permettent de les mettre en application, les biocapteurs font partie des filières technologiques les plus prometteuses. En effet, les biocapteurs apparaissent aujourd'hui comme des outils très élégants dans différents domaines : biotechnologies, technologies biomédicales, environnement, agro- alimentaires... En particulier, des besoins réels existent pour la détermination de divers métabolites et/ou toxiques dans différents milieux complexes. Les caractéristiques et les performances de ces dispositifs biocapteurs sont très attrayantes : sensibilité, fiabilité, commodité, simplicité, rapidité (économie des réactifs) et bon marché. L'apparition de plusieurs analyseurs commercialisés par plusieurs sociétés se basant sur différents systèmes de biocapteurs en est la preuve vivante.

Le principe de base des biocapteurs repose sur la combinaison d'un élément biologique (cellule, enzyme, anticorps...), d'un convertisseur de signal (transducteur) et d'un appareil électrique de mesure. L'élément biologique, par exemple l'enzyme glucose oxydase, plongé dans un milieu tel que le sang, se lie à une molécule pour laquelle il a de l'affinité, ici le glucose. La réaction qui s'ensuit s'accompagne de l'émission d'un signal qui est converti par l'appareil de mesure en une valeur de concentration. Cet exemple typique avait donné naissance au premier biocapteur et au premier analyseur de glucose utilisé par les diabétiques.

Dans le cadre de ce travail de thèse, on s'est intéressé à des transducteurs conductimètriques se basant sur des électrodes interdigitées en platine ou en or. Ces transducteurs présentent plusieurs avantages. En effet, non seulement ils ne nécessitent

pas d'électrodes de référence et ne sont pas sensibles à la lumière (comme certains capteurs potentiométriques) mais en plus ils sont de petites tailles, miniaturisables et s'adaptent à une production à grande échelle et à faible coût. D'autre part, plusieurs combinaisons de biorécepteurs ont été testés : enzymes, levure et enzyme-bactérie.

Ce manuscrit se compose de six chapitres. Le premier chapitre débute par une présentation générale du monde des biocapteurs avec un brin d'historique. Ensuite, vient une revue de la littérature sur les différents éléments dont se compose un biocapteur. En premier lieu, l'élément physique : les transducteurs, leurs principes de fonctionnement et quelques exemples d'application. Ensuite, les différents biorécepteurs et leurs techniques d'immobilisation les plus utilisées.

Le premier chapitre a été dédié à une présentation détaillée des microélectrodes conductimètriques, utilisées dans tout ce travail comme transducteurs. Pour cela, leur principe général a été présenté ainsi que leur mode de fabrication et le déroulement des mesures. Les électrodes interdigitées en or et en platine ont aussi été présentés.

Le troisième chapitre est consacré au développement d'un biocapteur enzymatique faisant intervenir la protéinase K pour la détermination des protéines dans les eaux naturelles comme indicateurs de la teneur en matière organique (MO), qui rend compte du degré de contamination urbaine de ces eaux.

Le quatrième chapitre traite quand à lui de la mise en place d'un biocapteur bienzymatique pour le dosage du lactose. Son application à des échantillons de lait a été testée pour montrer son efficacité.

Le cinquième chapitre montre la faisabilité d'un concept original utilisant l'association d'une bactérie mutante, dans laquelle le gène codant pour la β-galactosidase (β-gal) est induit par le sélénium (métalloïde toxique à forte dose), avec l'enzyme glucose oxydase pour la détection du sélénite. En effet, en présence de sélénite, la β-gal est produite puis détectée à la suite de l'addition de son substrat le lactose et son hydrolyse en galactose et glucose puis l'oxydation de ce dernier par la glucose oxydase.

Le sixième chapitre présente une étude préliminaire sur la faisabilité d'un biocapteur olfactif mettant en œuvre une levure génétiquement modifiée avec le gène du récepteur olfactif humain OR17-40. La possibilité de détecter l'hélional à l'aide du biocapteur développé à été étudiée.

Enfin, les conclusions générales de ce travail ainsi que les perspectives de recherche achèveront ce manuscrit.

Les biocapteurs

Sommaire

1.1 Généralités 7

1.1.1 Introduction 7

1.1.2 Définition 9

1.1.3 Historique 9

1.1.4 Classification des biocapteurs 10

1.1.5 Caractéristiques des biocapteurs 10

1.2 Les transducteurs 11

1.2.1 Les transducteurs électrochimiques 11

1.2.2 Les transducteurs optiques 19

1.2.3 Les transducteurs piézoélectriques 21

1.2.4 Les transducteurs thermiques 22

1.3 Les biorécepteurs 22

1.3.1 Les anticorps 23

1.3.2 Les récepteurs 24

1.3.3 Les acides nucléiques 25

1.3.4 Les cellules animales et végétales 26

1.3.5 Les tissus végétaux ou animaux 26

1.3.6 Les enzymes 26

1.3.7 Les microorganismes 34

1.4 Les méthodes d'immobilisation 36

1.4.1 Emprisonnement physique 36

1.4.2 Adsorption 37

1.4.3 Liaison covalente 37

1.4.4 Réticulation 37

1.5 Conclusion 40

Chapitre 1

Les biocapteurs

1.1 Généralités

1.1.1 Introduction

Au cours des 20 dernières années, la recherche et le développement dans le domaine des biocapteurs ont augmenté de façon exponentielle que ce soit en terme d'investissements, de nombre de publications scientifiques (par exemple en effectuant une recherche sur le site Science direct avec le mot "biosensor" plus que 6000 articles traitant du sujet ressortent) ou de nombre de chercheurs travaillant sur la thématique dans le monde entier. Cet intérêt croissant pour les biocapteurs peut être attribué aux progrès technologiques importants dans le domaine de la microélectronique (développements dans l'industrie des semi-conducteurs, transducteurs de plus en plus performants et miniaturisés...), des matériaux (matériaux nouveaux...), biologie moléculaire... De plus, les exigences de plus en plus poussées par rapport au contrôle de l'environnement (normes de plus en plus drastiques) ou de la qualité de vie ont fortement contribué à l'intérêt que suscitent les biocapteurs. En effet, le grand avantage des biocapteurs réside dans leur concept original autorisant la réalisation de systèmes de mesure intégrés, autofonctionnels, miniaturisables, aisés à mettre en oeuvre et ne nécessitant que peu ou pas de traitement de l'échantillon à analyser [Kau02]. De plus, nécessitant des connaissances pluridisciplinaires (figure 1.1), entre autres en biologie et en microélectronique, les biocapteurs ouvrent des perspectives considérables dans le diagnostic et l'industrie pharmaceutique et dans un grand nombre d'autres

domaines. En effet,au niveau de l'environnement et de l'agriculture, les biocapteurs pourraient jouer un rôle fondamental : contrôle de l'eau, détection des polluants, pollution des sols... En termes de sécurité, la détection immédiate des polluants utilisés comme armes chimiques est également primordiale, et certains pays comme les États-Unis mènent des programmes de Recherche et Développement spécifiques. Les biocapteurs pourraient aussi avoir des applications dans l'industrie alimentaire, au niveau du contrôle des procédés et de la prévention des risques.

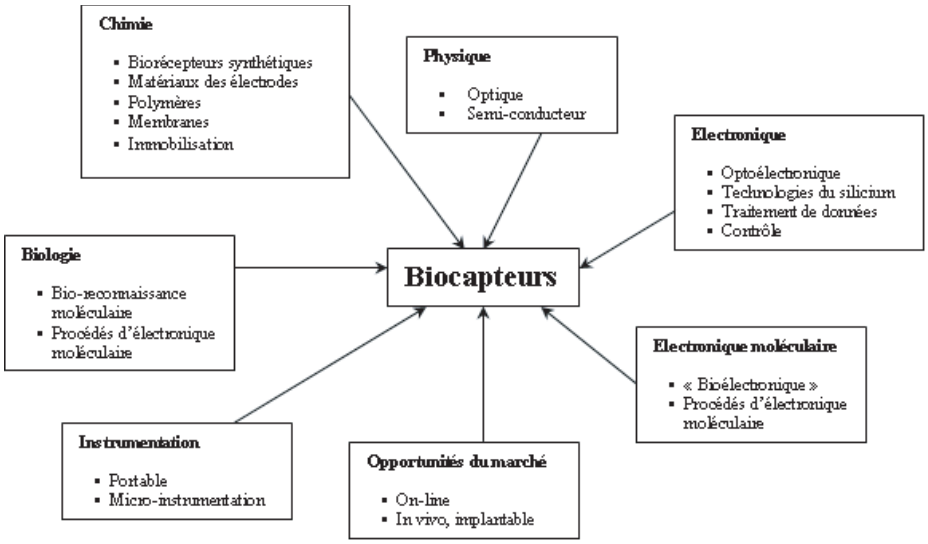


FIG. 1.1 – Pluridisciplinarité du domaine des biocapteurs

Le marché actuel des biocapteurs est en forte expansion, un tour d'horizon des nouveaux produits de ce type commercialisés ou en phase de l'être montre l'effervescence du secteur au niveau international. En effet, le marché mondial des biocapteurs en 1985 était estimé à 5 millions de dollars alors qu'aujourd'hui il dépasse les 5 billions [Tur05]. Les biocapteurs pour le glucose occupent encore aujourd'hui la plus grande part du marché en raison de la fréquence élevée du diabète insulino-dépendant (plus de 16 millions de diabétiques aux États-Unis d'Amérique). Le marché mondial pour les appareils portables destinés à mesurer les glycémies a été estimé en 2002 à 2,7 milliards de dollars par an [Kau02].

1.1.2 Définition

Par définition, un biocapteur est un outil analytique composé d'un élément biologique appelé biorécepteur lié à un transducteur. Le biorécepteur reconnaît spécifiquement une molécule du milieu et l'information biochimique qui en résulte est convertie par le transducteur en un signal analytiquement utile [TTDW01].

La construction d'un biocapteur est essentiellement basée sur l'immobilisation du biorécepteur sur le transducteur correspondant (figure 1.2). En effet, c'est grâce à la combinaison judicieuse d'un composant biologique et d'un transducteur qu'un biocapteur permet la détection et le dosage d'un composé d'intérêt dans un milieu complexe. Les premiers biocapteurs étudiés, puis mis sur le marché, sont des biocapteurs enzymatiques. Les enzymes constituent encore, à l'heure actuelle, le composant le plus utilisé dans le développement des biocapteurs.

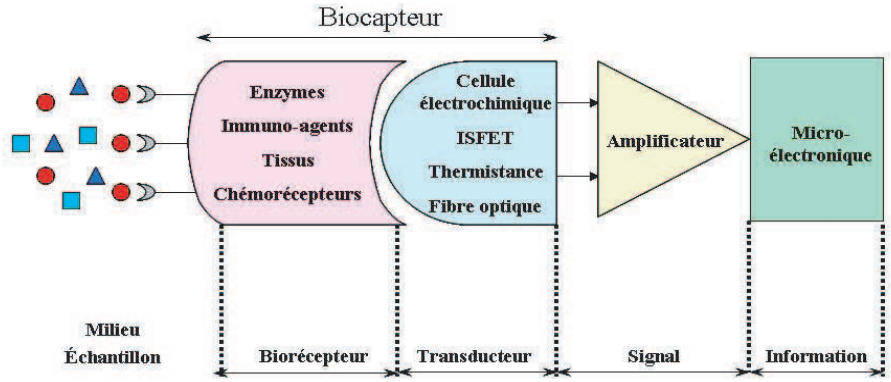


FIG. 1.2 – Représentation schématique d'un biocapteur

1.1.3 Historique

Les premiers développements de biocapteurs ont été faits par Clark [CL62] par l'association d'une membrane enzymatique contenant la glucose oxydase et une électrode à oxygène. Ensuite en 1967, Updike et Hicks ont mis au point une électrode enzymatique permettant le dosage de glucose dans une solution biologique [UH67] (La diminution de la concentration d'oxygène mesurée était proportionnelle à la concentration

en glucose). Les idées de Clark sont devenues réalité commerciale en 1975 avec la relance réussie (premier lancement 1973) de l'analyseur de glucose par Yellow Springs Instrument Company (Ohio) basé sur la détection ampérométrique du peroxyde d'hydrogène. Depuis ces premiers développements, l'intérêt porté aux biocapteurs ne cesse de grandir et des biocapteurs se basant sur d'autres types de transducteurs, autres que les électrodes ampèrométriques, destinés à des applications dans des domaines divers (biomédical, agro-alimentaires, environnement...), ont vu le jour.

1.1.4 Classification des biocapteurs

Les biocapteurs peuvent être classés selon plusieurs paramètres qui sont énumérés ci-après :

1. Classement par type de reconnaissance moléculaire (biorécepteur) : biocapteurs enzymatiques (avec une enzyme comme biorécepteur), biocapteurs immunologiques, biocapteurs microbiens...
2. Classement par type de transducteur associé : biocapteurs électrochimiques, biocapteurs optiques, biocapteurs calorimétriques...
3. Classement par espèce(s) détectée(s) : Les biocapteurs peuvent être classés également suivant les réactions qu'ils permettent de suivre. En effet, on peut les différencier selon le fait qu'il permettent de suivre directement un analyte ou une activité biologique ou indirectement à travers par exemple le suivi d'une inhibition de l'activité catalytique par des toxiques ou métaux lourds.

1.1.5 Caractéristiques des biocapteurs

Il s'agit ici des caractéristiques qui servent à évaluer un capteur et ses qualités analytiques. Les caractéristiques les plus utilisées sont les suivantes :

1. Sélectivité : c'est la capacité du biocapteur à distinguer entre des substrats différents. C'est un paramètre qui dépend principalement du composant biologique, bien que parfois le choix du transducteur puisse contribuer à la sélectivité.
2. Sensibilité : Ce paramètre correspond au rapport entre l'accroissement de la réponse du capteur et la variation correspondante de la grandeur à mesurer.

3. Reproductibilité : c'est parmi les paramètres les plus importants. Il indique la capacité du biocapteur à donner des réponses très voisines pour des mesures répétées de la même quantité de la grandeur à mesurer.
4. Exactitude : C'est l'accord entre le résultat de la mesure et la valeur vraie de la grandeur mesurée et l'écart est appelé erreur absolue.
5. Limite de détection : C'est la plus petite valeur de la grandeur à mesurer pouvant être détectée par le biocapteur d'une façon significativement différente du bruit de fond.

1.2 Les transducteurs

La combinaison d'un biorécepteur et d'un transducteur devrait déboucher sur un grand nombre de biocapteurs. En réalité, il faut qu'il y ait compatibilité entre le transducteur et le biorécepteur pour l'obtention d'un signal électrique. On ne peut pas, par exemple, utiliser un transducteur thermométrique si la réaction de transformation du substrat ne donne pas lieu à une variation d'enthalpie [Min91]. Quatre systèmes de transduction, basés sur des principes différents, sont généralement utilisés afin de convertir la reconnaissance moléculaire en un signal électrique exploitable.

1.2.1 Les transducteurs électrochimiques

Dans les systèmes de transduction électrochimiques, les mesures peuvent être conductimètriques, potentiométriques, ampérométriques ou impédimétriques...(voir tableau 1.1 [TTDW01]).

1.2.1.1 Les transducteurs ampéromètriques

L'ampérométrie est une technique qui repose sur la détermination de l'intensité de courant qui traverse une cellule électrochimique à un potentiel imposé. Elle est fonction de la concentration des espèces électroactives qui seront oxydées ou réduites à une électrode indicatrice, la seconde étant en général une électrode de référence. Il est donc possible, après étalonnage, de déterminer la concentration de certaines espèces présentes, par la mesure de l'intensité [Min91].

Type de mesure	Transducteur	Exemples d'éléments détectés
Potentiométrique	Électrode sélective d'ions Électrode de verre Électrode à gaz Électrode métallique	K^+, Cl^-, Ca^{2+}, F^- H^+, Na^+... CO_2 Espèces redox
Ampérométrique	Électrode métallique ou de carbone Électrode modifiée chimiquement	O_2, sucre, alcools... Sucres, alcools, phénols, oligonucléotides
Conductimètrique	Électrodes interdigitées	urée, espèces chargées
Impédancemétriques	Électrodes métalliques	oligonucléotides, antigènes...
Effect de charge	Transistor à effet de champ sélectif aux ions (ISFET) Enzyme FET (ENFET)	H^+, K^+ urée, créatinine...

TAB. 1.1 – Les transducteurs électrochimiques et les méthodes de mesure correspondantes

Les biocapteurs ampérométriques consistent généralement en une électrode dont la surface est recouverte d'un biofilm dans lequel sont immobilisées des biomolécules. Dans ce système, l'électrode est maintenue à un potentiel constant permettant d'obtenir l'électro-oxydation (ou la réduction) de l'un des produits de la réaction enzymatique à la surface de cette dernière générant ainsi un courant électrique dont l'intensité, dans certaines conditions, est proportionnel à la concentration en solution de l'espèce à doser. L'ampérométrie est parmi les modes de transduction les plus utilisés pour la mise en oeuvre de biocapteurs. La plupart des travaux publiés sur les biocapteurs ampèrométriques à base d'enzymes concernent le dosage du glucose dans le sang. Les biocapteurs ampèrométriques ont été divisés en trois générations :

1. Les biocapteurs de première génération ont été proposés par Clark et Lyon [CL62] et mis en application par Updike et Hicks, qui ont développé une électrode enzymatique permettant le dosage de glucose dans une solution biologique [UH67] (La diminution de la concentration d'oxygène mesurée était proportionnelle à la concentration en glucose). Les idées de Clark sont devenues réalité commerciale en 1975 avec la relance réussie (premier lancement 1973) de l'analyseur de glucose par Yellow Springs Instrument Company (Ohio) basé sur la détection ampérométrique du peroxyde d'hydrogène.

2. Les biocapteurs de seconde génération emploient un médiateur permettant le transfert d'électrons, qui remplace l'O_2. Différents médiateurs ont été employés comme le ferrocène, les quinones, colorants de quinoidlike, sels organiques conducteurs, et les viologènes... L'élimination de la dépendance par rapport à l'oxygène de la première génération, a permis de mieux contrôler la réaction enzymatique et les performances du capteur.
3. Les biocapteurs ampéromètriques de troisième génération sont marqués par la progression d'un système où le médiateur est libre vers un nouveau où l'enzyme et le médiateur sont co-immobilisés sur la surface de l'électrode. La co-immobilization de l'enzyme et du médiateur peut être accomplie par l'immobilisation préalable du médiateur de l'enzyme suivie de l'immobilisation de l'enzyme : l'immobilisation des enzymes dans un polymère redox, ou l'immobilisation de l'enzyme et du médiateur dans un polymère conducteur. Ces biocapteurs de troisième génération offrent tous les avantages des capteurs de seconde génération, avec de nouvelles caractéristiques. En effet, ces nouveaux biocapteurs présentent une nouvelle autonomie puisque ni l'enzyme ni le médiateur ne doivent être ajoutés dans le milieu de mesure ce qui facilite la réalisation de mesures répétées.

1.2.1.2 Les transducteurs impédancemétriques (ou impédimétriques)

La spectroscopie d'impédance électrochimique est une technique permettant d'étudier sensiblement une grande variété de propriétés chimiques et physiques. On observe actuellement de plus en plus de travaux publiés sur les biocapteurs impédimétriques [GMZ04, PM06]. Ces techniques ont été développées notamment pour caractériser la fabrication des biocapteurs et pour contrôler les réactions enzymatiques ou les phénomènes de reconnaissance moléculaire de fixation de protéines spécifiques, de lectines, de récepteurs, d'acides nucléiques, de cellules entières ou d'anticorps. Ces transducteurs s'appliquent avantageusement aux réactions d'affinité (antigène-anticorps, chémorécepteurs membranaires) car elles induisent de faibles variations de conductance et de capacitance au niveau de l'interface électrode-substrat immobilisé.

Dans notre laboratoire, plusieurs travaux ont été réalisés utilisant la spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS) pour le développement de biocapteurs. En effet, elle a été utilisée pour la caractérisation du comportement et des propriétés des

couches immuno-fonctionnalisées pour le développement d'immunocapteurs [Hle05, HHZ+06, HMA+06a]. De plus cette technique a été utilisée également comme moyen de transduction pour le développement d'immunocapteur pour la détection de l'atrazine [HMA+06b], l'hémoglobine [HMA+06a] ou encore d'odorants [HJRM+07].

Cependant, la caractérisation par la spectroscopie d'impédance électrochimique se fonde sur un système dont le comportement électrique dépend de divers paramètres qui sont sensibles à différents régimes ou fréquences. De plus, pour pouvoir modéliser les résultats des mesures d'EIS, il faut faire des mesures qui sont généralement assez longs puisqu'il faut de 10 minutes à plus de plusieurs heures pour enregistrer un spectre d'EIS. Évidemment, ceci dépend du processus de relaxation, de la stabilité du système à l'étude et de la gamme de fréquence choisie. Malheureusement, ceci peut mener à des erreurs d'interprétation puisque le système a pu avoir changé pendant le laps de temps de l'étude d'EIS [PM06]. Par contre, des études cinétiques des phénomènes de reconnaissance peuvent être réalisées en se fixant à une fréquence de l'ordre de la dizaine de Hz.

1.2.1.3 Les transducteurs potentiométriques

Généralités : La potentiométrie est une méthode électrochimique basée sur la mesure de la différence de potentiel entre une électrode de mesure et une électrode de référence. La détermination des potentiels des électrodes permet de mesurer directement la concentration de l'analyte à doser [Min91]. Dans ce type de système, un équilibre local est établi à la surface du capteur et conduit à la génération d'un potentiel proportionnel au logarithme de la concentration (activité) de l'échantillon selon la loi de Nernst (voir équation ci-après) :

$$E = E_0 + \frac{RT}{zF} \ln a$$

où :

E : Différence de potentiel qui s'établit, à l'équilibre, à l'interface entre le capteur et la solution de mesure

E_0 : Potentiel standard de l'espèce considérée

R : Constante des gaz parfaits

a : activité de l'ion à mesurer

T : Température absolue en Kelvin

z : Valence de l'ion

F : Constante de Faraday

Les premiers transducteurs potentiométriques utilisés sont : les électrodes de verre pour la mesure du pH ou des ions monovalents, les électrodes spécifiques sensibles aux anions et aux cations et les électrodes à gaz telles que l'électrode à pCO_2 ou pNH_3. Ces électrodes se prêtent facilement à la réalisation de biocapteurs. La mesure du potentiel se fait par l'intermédiaire d'une électrode de référence dont le potentiel est constant et pris comme origine. En général, c'est l'électrode au calomel qui est utilisée. Elle est plongée dans la solution et disposée à côté du biocapteur.

Le deuxième type de capteurs potentiométriques sont les transistors à effet de champ (FET-Field-Effect Transistor). La méthodologie d'ISFET (transistor à effet de champ sélectif aux ions) (figure 1.3) pour la mesure d'ions s'est développée sur la base du transistor MOSFET (transistor à effet de champ à base de métal/oxyde/silicium).

Et c'est grâce à ce transistor que Bergveld a montré que l'utilisation de dispositifs dont le principe repose sur l'effet de champ est possible en milieu électrolytique [Ber70]. L'isolant silice est alors directement au contact de la solution électrolytique et une chute de potentiel à sa surface devient témoin de modifications à l'interface isolant/solution. L'ISFET est donc, de par la nature de la surface de l'isolant, sensible au pH. Très vite, des efforts ont été concentrés afin de développer des membranes pouvant couvrir l'isolant et ainsi obtenir des capteurs sensibles à d'autres ions [Ber03].

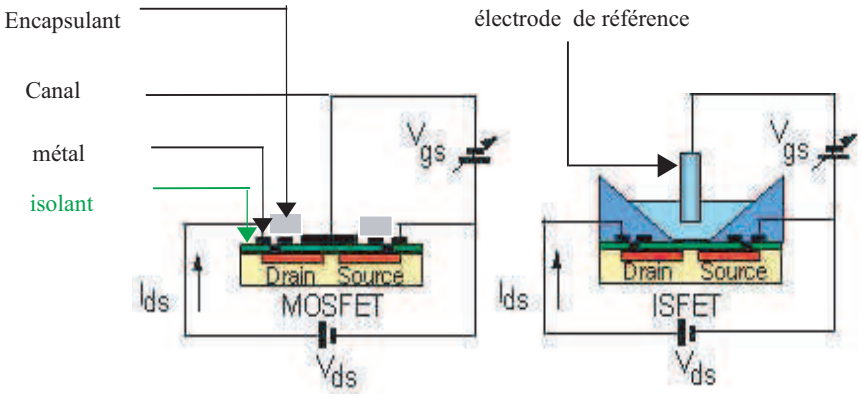


FIG. 1.3 – Représentation schématique des transistors MOSFET et ISFET

Exemples d'application : Dans notre laboratoire plusieurs capteurs à base d'ISFET ont été développés [SJRMC99, DSE+06, MDB+06]. Parmi ces capteurs, un ISFET pour la détection des ions ammonium a été mis en place. Pour se faire, une membrane contenant un ionophore (zéolithe) a être déposée sur la partie sensible de l'ISFET. Les zéolithes sont des aluminosilicates microporeux. Les différents types de zéolithes se distinguent par la proportion d'aluminium et de silicium et incidemment sur le diamètre des pores. Ainsi, les zéolithes n'ont pas de formule fixe, mais ils se caractérisent par un rapport (Al+Si)/O = $\frac{1}{2}$. La présence des pores (voir figure 1.4) permet la circulation d'espèces chimiques chargées et notamment l'ammonium pour cette zéolithe spéciale. Un capteur hautement sélectif pour l'ammonium avec une sensibilité de détection de 32 mV/p$N{H_4}^+$ et une limite de détection de 10^{-8} M a été obtenu [HKM+02].

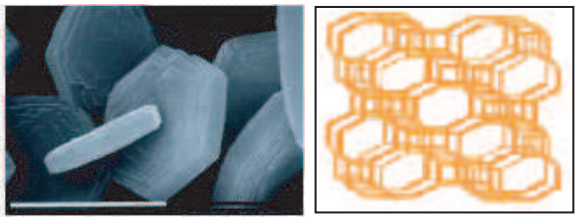


FIG. 1.4 – A gauche : photo au microscope électronique de la zéolithe ; A droite : schéma de la structure spatiale de la zéolithe

Sur la base de ce capteur contenant la zéolithe, un biocapteur pour le dosage de l'urée a été développé. En effet, dans les capteurs conventionnels à urée, des électrodes sélectives à pH [GSP$^+$97] et à ammonium [ABJ$^+$93], ont été utilisées pour détecter, respectivement, les ions H^+ ou ammonium produits par la réaction enzymatique. Le problème majeur des électrodes à pH est que la réponse du biocapteur est fortement dépendante de la capacité tampon de l'échantillon parce que le changement de pH produit au cours de la réaction de catalyse enzymatique est minimisé par le tampon utilisé, ce qui conduit à un intervalle dynamique étroit et une perte de sensibilité du capteur. C'est pourquoi le biocapteur qui a été proposé dans cette étude était basé sur celui décrit précédemment avec la membrane polymérique incluant la molécule de Zéolite. Ainsi, sur ce dernier une seconde membrane contenant des molécules d'uréase a été déposée (voir figure 1.5).

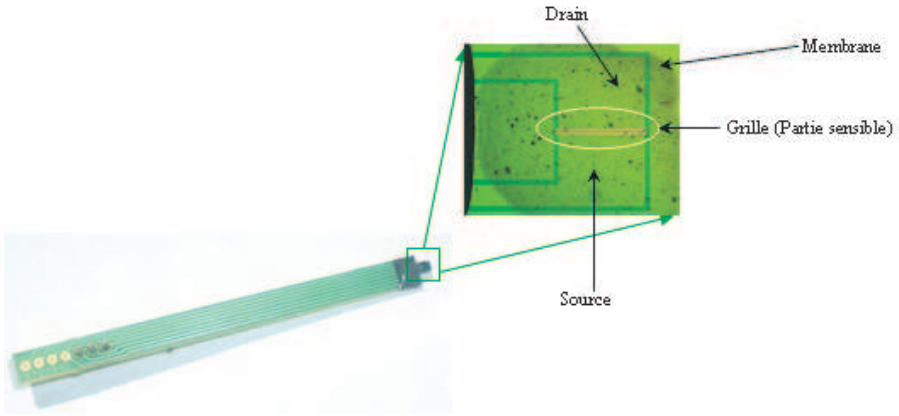


FIG. 1.5 – Photo du transducteur ISFET avec vue au microscope optique de la partie sensible avec la membrane enzymatique déposée

L'activité enzymatique et les caractéristiques analytiques, de l'ENFET (Enzymatic Field Effect) résultant, pour la détection de l'urée ont été étudiées ainsi que la possibilité de détermination de métaux lourds par l'intermédiaire d'un procédé d'inhibition de l'activité de l'uréase. La sensibilité de l'ENFET pour l'urée a été estimée à 15 mV/pUrée avec une stabilité dans le temps du biocapteur de plus de 15 jours et une limite de détection de 3.10^{-5} M. La détermination de l'activité résiduelle de l'uréase après exposition du biocapteur enzymatique à des métaux lourds tel que Hg(II) a montré l'efficacité d'utilisation de cet ENFET pour la détection des ions

mercures avec une limite de détection de 5.10^{-8} M [HRM+02].

Malgré d'importants travaux effectués par un certain nombre de laboratoires dans le domaine des ISFETs et ENFETs, avec un certain nombre de résultats fiables et prometteurs il n'y a toujours pas de version commerciale réussie d'un biocapteur de type ENFET. Cet état des choses peut être expliqué par le fait qu'il est difficile de concurrencer sur le marché existant des dispositifs traditionnels (par exemple électrodes de verre ou de pH) commercialisés par de grandes sociétés. Il faut notamment remarquer qu'il y a quelques années seulement il n'existait encore que des échantillons expérimentaux d'ISFET, tandis que de nos jours une douzaines de compagnies [DSE+06], y compris certaines tout à fait célèbres, sont impliquées dans leur fabrication et marketing.

1.2.1.4 Les transducteurs conductimétriques

La conductimétrie est une technique de mesure électrochimique alternative aux techniques potentiométriques et ampèrométriques. Cette technique a été relativement peu utilisée pour la mise au point de biocapteurs en comparaison des techniques potentiométriques et ampèrométriques. Cet écart est apparemment dû à une moins bonne connaissance des principes de fonctionnement de ce type de transducteurs et notamment des micro-électrodes interdigitées [DSP+94]. Cependant, ces dernières années, on a assisté à un intérêt croissant pour les biocapteurs conductimètriques vue le nombre d'avantages qu'ils offrent :

- ne nécessitent pas d'électrode de référence
- utilisation de tension alternative de petite amplitude ce qui permet d'éviter des processus faradique d'électrode
- ne sont pas photo-sensibles
- offrent des possibilités de miniaturisation avec un grand degré d'intégration quand la technologie en couche mince (thin-film technology), peu coûteuse, est employée.

Le paramètre mesuré est la conductivité/résistivité électrique de la membrane biologique. Quand on a un phénomène qui génère la production d'ions ou d'électrons, la conductivité/résistivité globales du milieu change. Le principe de mesure est détaillé dans le chapitre 2. Dans le domaine des biocapteurs, il peut être appliqué à la mesure

des réactions enzymatiques faisant varier la nature et/ou le nombre de porteurs de charges électriques dans la membrane enzymatique comme c'est le cas dans le cadre de notre étude où la conductimétrie va être appliquée au dosage des protéines dans les eaux naturelles par l'intermédiaire des acides aminés chargés libérés par l'action hydrolytique des protéases (voir chapitre 3) mais aussi à la détection du sélenium en utilisant l'action combinée de l'activité béta-galactosidase libérée par une bactérie et l'activité de la glucose oxydase immobilisée (chapitre 5). Le tableau 1.2 résume les résultats des développements dans le domaine des biocapteurs enzymatiques conductimètriques pendant ces dix dernières années [DAES06].

Substrat	Enzyme
Urée	Uréase
Créatinine	Uréase-créatinase-créatininase Créatinine-deiminase
L-asparagine	L-asparaginase
Glucose	Glucose oxydase
Peroxyde d'hydrogène	Peroxydase
D-aminoacides	D-aminoacidoxidase
Pesticides organophosphorés	Acétylcholinesterase Butyrylcholinesterase
Acétylcholine	Acétylcholinesterase Butyrylcholinesterase
Métaux lourds	Uréase
Pénicilline	Pénicillinase
Acide urique	Uricase
Protéines totales	Trypsine
Formaldéhyde	Alcoholoxydase
4-Chlorophenol	Tyrosinase
Triazine herbicides	Tyrosinase
Carbamate pesticides	Acétylcholinesterase

TAB. 1.2 – Données sur le développement de différents biocapteurs conductimètriques

1.2.2 Les transducteurs optiques

L'avènement des fibres optiques a ouvert de nouvelles voies de recherche dans le domaine des mesures de paramètres physiques tels que la pression, la température,

l'accélération... mais aussi dans le domaine des biocapteurs. Les fibres optiques sont des guides d'ondes électromagnétiques pour les fréquences optiques (domaine du visible à l'infra rouge). Elles ont l'aspect d'un fil souple dont le diamètre extérieur peut varier de quelques 125 μm (fibres de silice) à quelques mm (fibres en plastique) et dont le cœur présente un indice de réfraction plus élevé que celui de la gaine. Ici, le système de mesure s'appuie sur les modifications des propriétés optiques engendrées par la reconnaissance moléculaire (variation de l'absorbance, de la fluorescence...). L'élément biologique (en général enzyme) est immobilisé, en présence d'un intermédiaire (colorant), à l'extrémité ou sur la surface de la fibre optique qui est en contact avec l'échantillon.

Il faut aussi signaler l'existence de systèmes optiques utilisant la résonance plasmonique de surface. En effet, depuis la découverte, par Kretschmann et Otto en 1968 du phénomène physique d'excitation optique de plasmon de surface, cette technologie a connu un développement grandissant dès lors que son utilisation pour la détection de gaz et de composants biochimiques s'est révélée pertinente.

Les biocapteurs se basant sur la résonance de plasmon de surface (SPR) ont été appliqués largement dans des domaines nécessitant le suivi d'interactions biomoléculaires en temps réel [KK99]. Ceci est dû non seulement au fait que la technique SPR peut fournir des données sur l'affinité et la cinétique mais aussi au fait qu'elle constitue un dispositif unique permettant l'analyse de différentes interactions du type peptide-protéine et ceux concernant les fixations cellulaires [BKC$^+$06].

L'introduction récente d'appareils commerciaux utilisant cette technique dans les laboratoires de recherche biologique, chimique et médicale (par exemple pour la détection de pathogènes [MB06]) a ainsi révolutionné l'étude des interactions moléculaires. Aujourd'hui, plusieurs sociétés, dont la pionnière et la plus développée Biacore AB (Suède), ont acquis un savoir faire et une maîtrise du procédé. La technologie BIAcore permet d'étudier les interactions entre biomolécules sans marquage, dans un débit continu de tampon. Un des réactifs, le ligand, est retenu de manière spécifique sur une interface appelée *sensor chip*. Les autres paramètres de l'interaction (ou analytes) sont injectés à un débit constant par un circuit microfluidique au contact de l'interface. Les *sensor chips* les plus fréquemment utilisés sont constituées d'un support de verre recouvert d'une fine couche d'or et d'un hydrogel non réticulé de dextran carboxylé. Ces surfaces conviennent à l'étude de molécules hydrosolubles

(protéines, acides nucléiques, glycoprotéines, etc.) dans un milieu hydrophile [TL96].

1.2.3 Les transducteurs piézoélectriques

Le phénomène de piézoélectricité se manifeste par l'apparition d'une polarisation électrique dans certains matériaux diélectriques anisotropes (absence de centre de symétrie dans la maille cristalline) lorsqu'ils sont déformés sous l'effet d'une force de direction convenable. Si l'on constitue un condensateur en déposant une paire d'armatures métalliques sur les faces opposées d'une lame piézoélectrique, il apparaît, sous l'influence d'une force, des charges de signes contraires sur les armatures opposées et donc une différence de potentiel, proportionnelle à la force appliquée. L'effet piézoélectrique est réversible : soumis à un champ électrique, de direction convenable, un matériau piézoélectrique se déforme ; il peut en particulier être excité à sa résonance mécanique, qui est aiguë. Cette propriété trouve application dans des capteurs piézoélectriques utilisant le quartz dont la résonance se produit à une fréquence sensible à différentes grandeurs physiques (température, pression) qui peuvent être mesurées avec le capteur ainsi constitué [JRMC].

Étant donné que le phénomène de reconnaissance moléculaire s'accompagne d'une variation de masse dans le cas des systèmes d'affinité, ceci peut être avantageusement exploité de manière analytique grâce à l'utilisation de ces capteurs piézoélectriques. L'élément biologique sélectif est immobilisé sur un quartz vibrant. Le cristal de quartz est un oscillateur très précis et stable. Le cristal de quartz est le composant primordial de la microbalance parce qu'il enregistre quantitativement la masse déposée sur ses électrodes : lorsque le substrat se fixe sur la surface du biocapteur, la fréquence d'oscillation du cristal décroît [KPA$^+$06]. Ces systèmes de détection sont très sensibles (détection de picogrammes) ils peuvent convenir pour les mesures en phase gazeuse (modification de la surface du cristal par des composés organiques ou biologiques qui vont fixer un substrat gazeux qui peut permettre d'avoir une meilleure sensibilité de détection [BJR98]) et en milieux liquides (les applications concernent surtout les grosses molécules (anticorps, virus) car les variations de masse sont plus nettes).

1.2.4 Les transducteurs thermiques

L'intérêt de la mise en oeuvre des capteurs enthalpimétriques résulte du fait que la plupart des réactions biologiques s'accompagnent d'un dégagement de chaleur. De nature très générale et donc de potentialité élevée, ces capteurs sont cependant relativement peu sensibles et nécessitent des montages différentiels très bien équilibrés afin de compenser toute variation de température parasite.

Le changement de temperature, ΔT, est determiné par un microcalorimètre et est relié aux variations d'enthalpie, ΔH, et la capacité de chaleur du réacteur, Cp par la relation suivante :

$$\Delta T = \frac{n\Delta H}{Cp} \tag{1.1}$$

avec : n : nombre de moles de substrat ayant réagit

Malgré l'attrait du caractère universel de la technique, des problèmes d'ordre technologique, liés notamment aux difficultés d'immobilisation de quantités suffisantes d'enzymes au proche contact de la sonde calorimétrique, limitent les performances de ces biocapteurs.

1.3 Les biorécepteurs

Plusieurs biorécepteurs ont été utilisés comme élément de reconnaissance moléculaire pour le développement de divers biocapteurs (voir figure 1.6).

L'élément de reconnaissance biologique (ou biorécepteur) peut être :

1. Un élément de reconnaissance biocatalytique : dans ce cas, la réponse du biocapteur est basée sur une réaction catalysée par les macromolécules qui sont présents dans leur environnement biologique naturel, qui ont été préalablement extraits ou qui ont été produits dans des microorganismes. Ainsi, la consommation continue du(des) substrat(s) est assurée par le biocatalyseur immobilisé à la surface du transducteur. Des réponses dynamiques ou après que l'état stationnaire du signal soit atteint, sont enregistrées à l'aide du transducteur intégré.

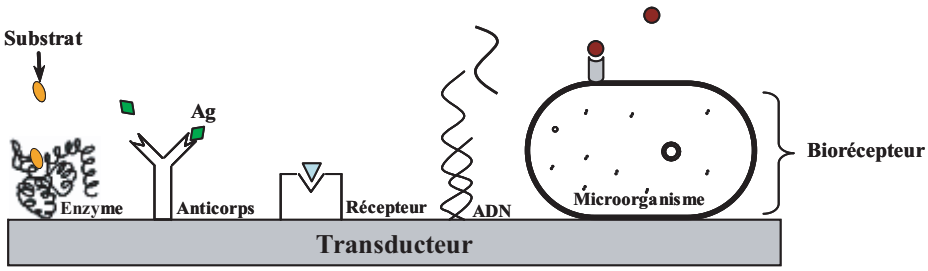


FIG. 1.6 – Représentation schématique des différents biorécepteurs

Trois types de biocatalyseurs sont généralement utilisés : (a) Les enzyme : le biorécepteur le plus utilisé et le mieux développé à l'échelle industrielle. (b) Cellules entières (micro-organismes, tels que les bactéries, mycètes,levures, ou cellules eucaryotes) ou organelles de cellules ou particules (mitochondries, paroi cellulaire). (c) Partie de tissu (tissu végétal ou animal). Les biocapteurs faisant intervenir un élément de reconnaissance biocatalytique sont les plus utilisés et seront le type de biocapteurs auxquels on s'est intéressé dans ce travail.

2. Un élément d'affinité biologique ou de bio-complexation : dans ce cas la réponse du biocapteur est basée sur l'interaction de l'analyte avec des macromolécules. Ainsi, un équilibre est généralement atteint et il n'y a aucune autre consommation nette de analyte par l'agent complexant immobilisé. Ces réponses à l'équilibre sont aussi suivies par le transducteur qui est en contact étroit avec le biorécepteur. La plupart des biocapteurs se basant sur ce type de reconnaissance utilisent des systèmes anticorps/antigènes [LSC01]. Cependant, plus récemment, des biocapteurs utilisant des systèmes récepteurs/antagoniste ont été développés (ex les chémorécepteurs).

1.3.1 Les anticorps

Les anticorps sont généralement immobilisés chimiquement à la surface du transducteur. L'immobilisation doit être judicieusement contrôlée afin d'assurer une orientation uniforme des sites récepteurs pour une réaction d'affinité optimale. L'interaction avec un antigène ou haptène est spécifique et sa détection peut être amplifiée à l'aide de marqueurs fluorescents ou enzymatiques. Les immunocapteurs résultants

ont été notamment appliqués pour la détection de plusieurs pathogènes : *Legionella pneumophila* à l'aide d'un biocapteur se basant sur la résonance plasmonique de surface [BOL+04] ; *Campylobacter jejuni* à l'aide d'un immunocapteur ampérométrique [CLS01] ; *Salmonellae* à l'aide d'un biocapteur ampérométrique comme dans les travaux de Gehring et al. [GCM+99] ou d'un immunocapteur optique comme dans les travaux de Kim et al. [KPK06].

1.3.2 Les récepteurs

Les différentes cellules de l'organisme reçoivent les informations nécessaires à la modulation de leur activité par l'intermédiaire de signaux et de molécules extracellulaires. Ces dernières, que ce soient des hormones, des neurotransmetteurs, des molécules d'odorants ou bien des facteurs de croissance, viennent la plupart du temps se lier à des protéines réceptrices qui font partie intégrante de la membrane plasmique de la cellule cible, et qui vont permettre la transmission de l'information à l'intérieur de la cellule. Les récepteurs membranaires, eux, constituent l'interface entre un stimulus extracellulaire et sa perpétuation dans le cytosol. Ces récepteurs appartiennent à plusieurs classes de protéines, que l'on peut différencier selon leur mode d'action et leur structure moléculaire :

- Une première classe de récepteurs comprend les canaux ioniques activés par un ligand, comme par exemple les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine, les récepteurs de la glycine et les canaux P2X activés par l'ATP.
- Une deuxième classe regroupe les récepteurs comportant une activité enzymatique associée, activable par la liaison du ligand. Cette activité enzymatique, de type tyrosine-phosphorylase, serine/thréonine-phosphorylase ou encore guanylate cyclase, peut être intrinsèque ou bien directement associée à la protéine réceptrice. Les récepteurs de l'insuline, du facteur de croissance des fibroblastes (EGF), du facteur de croissance des neurones (NGF) ou encore du peptide natriurétique atrial (ANP), en font partie.
- Enfin, la troisième grande classe aux nombreux représentants, est composée de récepteurs transduisant le signal par l'intermédiaire de protéines hétérotrimériques, les protéines-G, donc l'activation par la liaison du ligand à son récepteur va entraîner la modulation de l'activité de différents effecteurs intracellulaires.

Ces derniers peuvent être des enzymes (adénylate cyclase, GMPc phosphodiestérase, phospholipases...), des canaux ou des échangeurs ioniques. Les récepteurs olfactifs appartiennent à cette classe.

Un grand nombre de travaux de recherche dans le domaine des récepteurs concerne les neurotransmetteurs, les antagonistes et les neurotoxines. Les neurotransmetteurs (ou chémorécepteurs), les récepteurs hormonaux et les récepteurs olfactifs sont les plus utilisés pour le développement de biocapteurs. La fixation du ligand (agoniste sur le récepteur déclenche une réponse physiologique amplifiée qui se traduit par : (a) l'ouverture de canaux ioniques, (b) induction d'un autre récepteur, (c) activation d'enzyme(s).

1.3.3 Les acides nucléiques

Les acides nucléiques sont des macromolécules biologiques agencées sous forme de chaînes polymériques constituant le matériel génétique cellulaire. Ils peuvent être immobilisés en tant que tels (double brin) sur un transducteur physique afin d'étudier des interactions avec des drogues synthétiques ou sous forme d'une seule chaîne d'acides nucléiques (un seul brin) dans le but de détecter des processus d'hybridation [PF01]. La détection d'un fragment d'ADN spécifique par hybridation avec une chaîne d'ADN complémentaire a gagné un intérêt considérable ces dernières années en raison de son importance pour le diagnostic précoce des maladies, tels que le cancer, "l'hypercholesteremia",... Le décodage du génome humain a sensiblement favorisé ce développement [SWWL01]. Le principe de transduction le plus utilisé avec ce type de biorécepteur est la détection optique des oligonucléotides marqués à l'aide de fluorochromes. L'analyse parallèle d'un grand nombre de fragments d'ADN peut être aussi réalisée à l'aide de la technique des biopuces à ADN. L'utilisation de l'ADN double brin immobilisé sur un transducteur optique ou électrochimique a aussi connu des développements considérables pour le screening rapide de toxines ou de substances organiques carcinogènes mais aussi pour l'identification de nouveaux principes actifs anti-tumoraux [MA04].

1.3.4 Les cellules animales et végétales

Certains biocapteurs ont été réalisés à partir de cellules animales et végétales (issues de cultures cellulaires) dont l'immobilisation sur des transducteurs potentiométriques (ISFET sensibles au pH) ou optiques (fibre optique) peut avantageusement être exploitée pour l'étude de l'influence de paramètres exogènes sur l'activité cellulaire [Kau02].

1.3.5 Les tissus végétaux ou animaux

Certains tissus animaux ou végétaux ont été utilisés pour le développement de biocapteurs : par exemple, de fines tranches de tissus végétaux (banane pour la détection de dopamine, feuille de concombre pour la détection de cystéine...) ou tissus animaux (muscles de lapin pour l'adénosine 5'monophosphate, foie de lapin pour la guanine...)... De tels systèmes de reconnaissance moléculaire ne nécessitent pas d'extraction ni de purification, par contre leur sélectivité et leur sensibilité sont souvent limitées et leur mise en oeuvre est complexe.

1.3.6 Les enzymes

Les enzymes sont des protéines globulaires qui jouent le rôle de catalyseurs biologiques, c'est-à-dire qu'elles règlent et accélèrent la vitesse des réactions biochimiques sans toutefois être modifiées ou détruites au cours de ces réactions. Les enzymes accélèrent 10^3 à 10^6 fois la réaction correspondante qui se déroulerait sans catalyseur. En abaissant l'énergie d'activation de la réaction qu'elle catalyse, une enzyme abaisse le niveau énergétique de l'état de transition et accélère ainsi la réaction. Les enzymes ont une stéréospécificité tellement forte qu'elles effectuent des réactions leur permettant de choisir parmi différents énantiomères ou de discriminer d'autres groupes pratiquement identiques entre eux.

Certaines enzymes sont de nature purement protéique. D'autres sont formées de deux parties : une protéine et un cofacteur. Le cofacteur peut être l'ion d'un métal, notamment du cuivre ou du fer, ou une molécule organique nécessaire à la réaction. La plupart des cofacteurs organiques sont des dérivés des vitamines (surtout des vitamines du complexe B). Étant donné qu'ils travaillent en synergie avec les enzymes,

ces cofacteurs sont appelés coenzymes.

Les enzymes se différencient des catalyseurs chimiques par leur très grande spécificité. Elles sont groupées en six classes :

- les oxydoréductases : catalysent les réactions d'oxydoréduction. Cette classe comprend les déshydrogénases, les oxydases, les hydrolases, etc. ;
- les transférases : interviennent dans les réactions de transfert d'un groupement fonctionnel sur un récepteur ;
- les hydrolases : coupent les liaisons esters, osidiques et peptidiques pour les hydrolyser ; les protéases, qu'on va utiliser dans ce travail, appartiennent à cette classe d'enzymes ;
- les lyases : catalysent la fixation ou le départ d'un groupement chimique avec création d'une double liaison sur le substrat ;
- les isomérases : interviennent dans les réactions d'isomérisation, de racémisation, d'épimérisation, de conversion cis-trans ;
- les ligases, ou synthétases : permettent la formation de liaisons C-O, C-S, C-N ou C-C. Ce type de réaction ne peut se produire que si elle est couplée avec l'hydrolyse d'un nucléoside-triphosphate.

Ainsi, selon l'appartenance à l'une de ces six classes numérotées de 1 à 6, chaque enzyme a un numéro. On peut trouver aisément, dans "Enzyme Nomenclature", le numéro, la réaction catalysée et quelques références bibliographiques pour chaque enzyme.

1.3.6.1 Les protéases

Généralités : Les protéases ou protéinases EC 3.4.., sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des liaisons peptidiques d'une protéine. Les protéases ou enzymes d'hydrolyse des protéines se répartissent en exopeptidases et endopeptidases. Les premières détachent les acides aminés un à un à partir de leur extrémité N-terminale ou C-terminale. Les endopeptidases, ou plus communément protéases, hydrolysent les protéines au niveau de sites internes spécifiques. La spécificité de la réaction est basée sur la nature des acides aminés de l'enzyme formant la poche catalytique, et donc interagissant avec les acides aminés du substrat. Cette interaction peut conduire à

une basse spécificité telle que pour la protéinase K où les acides aminés ne sont pas spécifiques mais doivent être de nature aliphatique, aromatique ou hydrophobe, ou à une très haute spécificité.

Classification : La classification des protéases est définie par la nature des acides aminés qui forment la poche catalytique :

- Les protéases à sérine : sont très répandues dans la nature et forment une famille d'enzymes apparentées entre elles ainsi qu'avec certaines estérases. Toutes ces protéines ont en commun d'avoir un pôle sérine (voir figure 1.7 [1]) capable de former une liaison covalente avec le DIFP (Diisopropylfluorophosphate). Cette classe peut être subdivisée en deux sous-groupes : le groupe des protéases similaires à la trypsine et le groupe des protéases similaires à la subtilysine.
- Les protéases à cystéine : ce sont des protéases où la cystéine joue dans le site actif le rôle qu'avait la sérine chez les protéases à sérine. Parmi ces enzymes, on trouve les lysosomes porteurs de cathepsines B et L et la papaïne. Ces endopeptidases présentent des homologies de séquence et ont des masses moléculaires dans la gamme des 25 kD.
- Les protéases à aspartate : ce sont des protéases qui n'utilisent ni la sérine ni la cystéine dans leur site actif mais l'acide aspartique. Parmi ces enzymes, on trouve la pepsine et la chymosine.
- Les métallo-protéases : les enzymes appartenant à cette famille sont inhibées pour la plupart par les complexants des métaux. Par exemple, la thermolysine qui est une protéase dont chaque molécule contient un ion zinc et quatre ions calcium.

[1] http ://delphi.phys.univ-tours.fr/Prolysis/Images/mecaser.gif

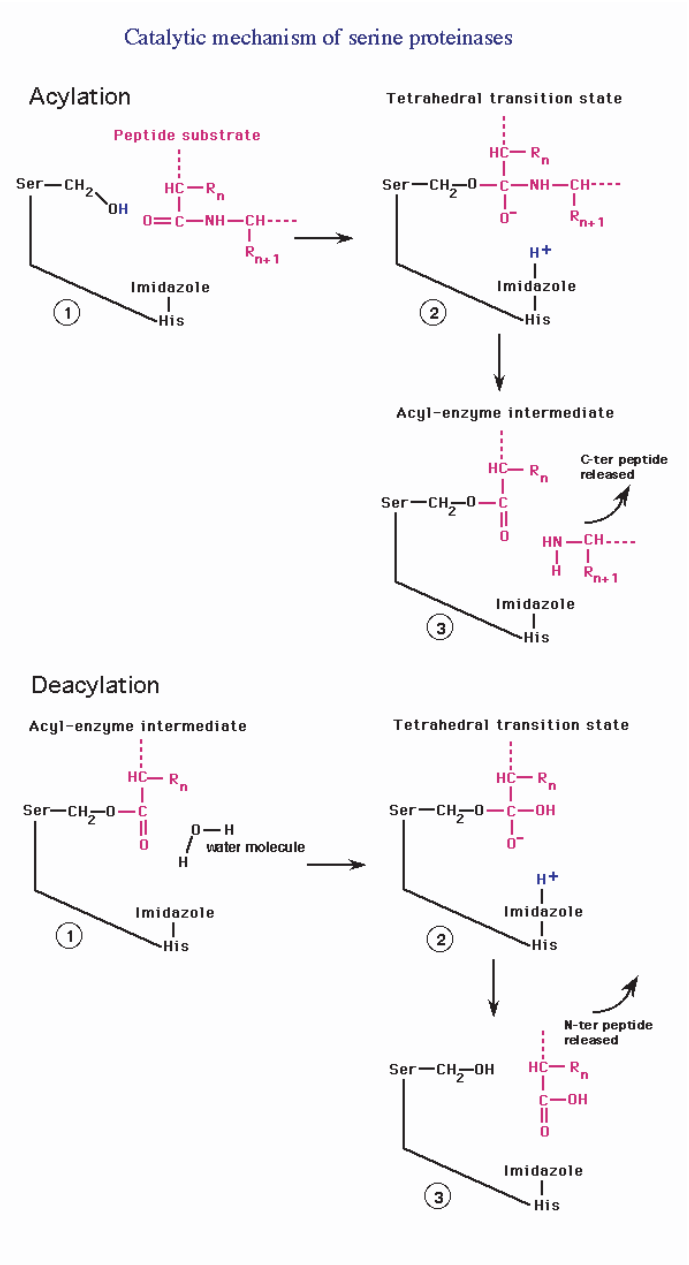


FIG. 1.7 – Schéma explicatif du mécanisme moléculaire impliqué lors de l'hydrolyse protéique catalysée par les protéases à sérine

1.3.6.2 La protéinase K

La protéinase K (EC 3.4.21.14) est une protéase classée parmi les endopeptidases à sérine. Beaucoup de travaux se sont intéressés à cette enzyme [EHK$^+$74, KF76, JM85, BPS$^+$86] et notamment celle extraite du champignon *Tritirachium album Limber* vue qu'elle représente l'une des endopeptidases à sérine les plus actives [BPS$^+$86]. Elle hydrolyse les protéines de toutes origines en quelques heures avec une préférence pour les liaisons peptidiques situées après les acides aminés hydrophobes. En effet, le site actif de la proteinase K se compose de plusieurs sous-sites capables de se combiner avec un certain nombre de résidus d'acides aminés. La position S1 se compose vraisemblablement d'une zone hydrophobe qui interagit avec les chaînes latérales de l'alanine, de la leucine, de la phénylalanine et de la tyrosine [KF76]. Le pH optimum pour l'activité enzymatique de la protéinase K de Tritirachium album est entre 7,5 et 12 (utilisant l'hémoglobine comme substrat) [EHK$^+$74].

1.3.6.3 Capteurs enzymatiques

Principe de fonctionnement : Un capteur enzymatique est la combinaison d'un transducteur (électrochimique, optique..) avec une fine couche enzymatique. Il est généralement utilisé pour suivre la quantité de substrat ou d'inhibiteur de l'enzyme [DAE$^+$01]. La réaction enzymatique assure la transformation du substrat en produit de réaction détectable par le transducteur (voir figure 1.8).

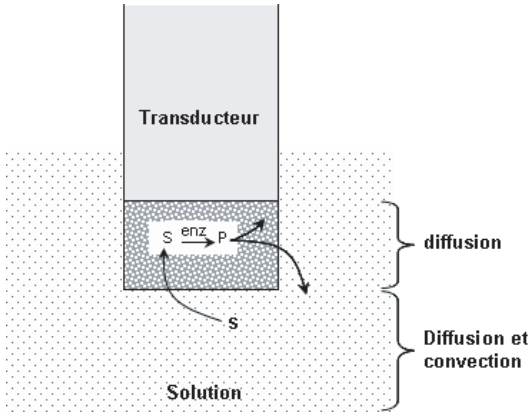


FIG. 1.8 – Représentation schématique du fonctionnement d'un biocapteur enzymatique

Le processus de fonctionnement de l'électrode enzymatique passe par 5 étapes [GdON85] :
- transport du substrat de la solution vers la membrane enzymatique ;
- diffusion dans la membrane enzymatique vers le site actif ;
- réaction de catalyse de la transformation du substrat ;
- migration du produit de la réaction, de la membrane vers la surface de l'électrode ;
- mesure de la variation du signal électrique due à la concentration du produit de la réaction.

La première étape, transport du substrat vers la membrane, dépend principalement du régime de convection assuré par la vitesse d'agitation de la solution. Ainsi, une agitation rapide apportera le substrat très rapidement à la surface de l'électrode. Avec une membrane très mince et en utilisant une enzyme fortement active, les étapes 1 et 4 sont éliminées ou réduites au minimum.

Cinétique enzymatique : En 1913, L. Michaelis et M. Menten ont proposé un modèle pour décrire les réactions enzymatiques dans lequel ces réactions se déroulent en 2 étapes :
- formation rapide d'un complexe enzyme-substrat (E-S)
- conversion lente du complexe en produit

Ainsi, on peut dire que l'enzyme assure la transformation du substrat en produit de réaction selon la réaction suivante :

$$\mathrm{E} + \mathrm{S} \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} \mathrm{ES} \xrightarrow{k_2} \mathrm{E} + \mathrm{P} \tag{1.2}$$

où :

E : enzyme ; S : substrat ; P : produit de la réaction

k_1, k_{-1}, k_2 : constantes de vitesse de réaction

La vitesse de la réaction s'écrit alors :

$$V = \frac{d[P]}{dt} = -\frac{d[S]}{dt} = V_m \frac{[S]}{K_m + [S]} \tag{1.3}$$

où :

K_m : la constante de Michaelis ; avec : $K_m = \frac{k_{-1}+k_2}{k_1}$;

V_m : la vitesse maximale pour $[S] >> K_m$; avec : $V_m = k_2[E_0]$,

$[E_0]$ est la concentration initiale en enzyme ;

[S] et [P] : concentrations respectives du substrat et du produit de la réaction

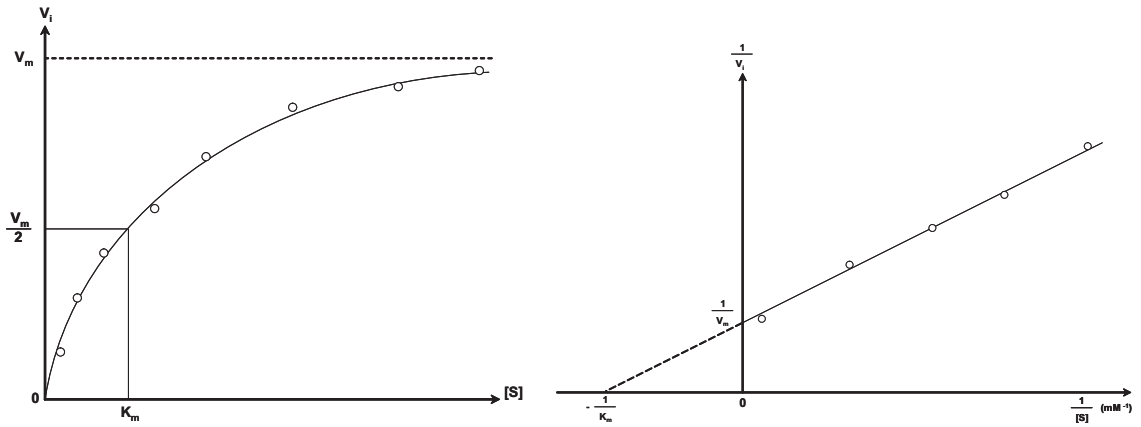
L'état stationnaire de la formation de ES est atteint en moins d'une milliseconde [Bur00] après mise en contact de l'enzyme avec son substrat.

Lorsque $[S] >> K_m$, c'est la cinétique enzymatique qui est limitante et la vitesse de réaction est égale à la vitesse maximale Vm. Ainsi, si on fait varier la concentration de substrat (à concentration constante d'enzyme), on peut représenter les valeurs de vitesse V_i en fonction de la concentration du substrat. La courbe obtenue (voir figure 1.9a) permet de déterminer au niveau de l'asymptote le V_m apparent et pour $\frac{V_m}{2}$ la concentration du substrat égale au K_m apparent (constante de Michaelis).

Étant donné que la détermination de V_m à partir de la figure 1.9a n'est pas très exacte, Lineweaver et Burk ont mis au point la représentation en double inverse qui est représentée sur la figure 1.9b. En effet, si on calcule, à partir de l'équation (1.3), $\frac{1}{V_i}$ on obtient l'équation (1.4).

$$\frac{1}{V_i} = \frac{K_m}{V_m} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_m} \tag{1.4}$$

$\frac{1}{V_i} = f(\frac{1}{[S]})$ est une droite (représentée sur la figure 1.9) dont les intersections extrapolées permettent la détermination des valeurs de K_m et de V_m. Quand S$\longrightarrow \infty$ $\frac{1}{S} \longrightarrow 0$; $\frac{1}{V_i} \longrightarrow \frac{1}{V_m}$; quand $V_i \longrightarrow \infty$ $\frac{1}{V_i} \longrightarrow 0$, $\frac{1}{S} \longrightarrow -\frac{1}{K_m}$.



(a) (b)

FIG. 1.9 – (a) Détermination des constantes michaeliennes (b) Représentation en double inverse de Lineweaver et Burek

Ainsi, cette représentation en double inverse permet de déterminer par extrapolation sur une droite (à $[S] \longrightarrow \infty$ et $V_i \longrightarrow \infty$) les valeurs de K_m et de V_m. K_m permet de choisir la concentration de S selon le type de dosage : $S < K_m$ pour doser S ; $S > 10\ K_m$ pour doser E.

1.3.6.4 Influence du pH

L'effet du pH sur la réponse d'un capteur enzymatique est principalement liée à l'effet du pH sur l'activité enzymatique. En effet, chaque enzyme possède un domaine de pH dans lequel elle est active ; au-delà de cet intervalle l'enzyme est inactivée. Cette courbe est généralement en forme de cloche avec un pH optimum et il faut essayer de travailler à un pH le plus proche possible de ce pH optimum. La sensibilité au pH des activités enzymatiques peut être expliquée par le fait que les substrats et les sites actifs des enzymes portent souvent des groupes fonctionnels acides ou basiques dont l'ionisation varie avec le pH. Ces effets de pH varient d'une enzyme à une autre.

1.3.6.5 Influence de la température

Étant donné que ces biocapteurs se basent sur une réaction enzymatique, une augmentation de la température augmente l'activité catalytique, donc la vitesse de réaction. Cependant, ceci n'est valable que jusqu'à une valeur maximale, au-delà de cette température une dénaturation progressive de l'enzyme a lieu. La température augmente également la vitesse de diffusion des différentes espèces chimiques dans la membrane enzymatique, ce qui diminue le temps de réponse du biocapteur.

1.3.7 Les microorganismes

Après le développement considérable observé dans le domaine des capteurs enzymatiques depuis la première électrode mise en place par Clark et Lyon en 1962 [CL62], l'extension du développement de ces biocapteurs vers l'utilisation d'autres espèces biologiques actives tels que les microorganismes est naturelle. En effet, l'utilisation de cellules entières présente plusieurs avantages [TT87] :

- régénération *in situ* des coenzymes ;
- permet d'éviter le long et coûteux processus d'extraction-purification que nécessitent les autres biorécepteurs tels que les enzymes, les acides nucléiques...
- la biosélectivité et la réactivité additionnelle de la membrane cellulaire peuvent être exploités avantageusement ;
- possibilité de régénérer le biocatalyseur *in situ* sans nécessité de reconstruire le biocapteur.
- avec l'avancement considérable dans les techniques de biologie moléculaire et de l'ADN recombinant, d'extraordinaires possibilités de transformer génétiquement des microorganismes en vue d'améliorer leurs activités enzymatiques ou de leur permettre d'exprimer de nouvelles activités ont amélioré davantage les performances des microorganismes.

Ainsi, plusieurs types de microorganismes ont été utilisés pour mettre au point des biocapteurs microbiens [LCM06]. Les microorganismes utilisés peuvent être des bactéries, levures ou champignons. Quelques exemples de biocapteurs microbiens sont illustrés dans le tableau 1.3 [LCM06].

Substrat	Microorganismes	Limite de détection
Biocapteurs microbiens ampérométriques		
DBO	*B. subtilis*	2-22 mg/l
DBO	*Pseudomonas sp.*	1-40 mg/l
DBO	Levure SPT1 et SPT2	2 mg/l
DBO	*P. putida*	0.5 mg/l
DBO	*T. candida*	7-75 ppm
Éthanol	*G. suboxydans*	0-25 mg/l
Éthanol	*A. niger*	1-32 ppm
Éthanol	*C. tropicalis*	0.5-7.5 mM
Éthanol	*A. aceti*	$<$ 0.2 mM
Sucre total	*G. oxydans*	1.1-2.2 g/l
Sucrose	*S. cerevisiae*	6-100 mM
Composés phénoliques	*P. putida*	0.1-1.0 μM
Cu^2+	*S. cerevisiae* recombinante	0.5-2 mM
Biocapteurs microbiens potentiométriques		
Organophosphates	*Flavobacterium sp.*	0.025-0.4 mM
Organophosphates	*E coli*	2 μm
Organophosphates	Levure SPT1 et SPT2	2 mg/l
Pénicilline	*E. coli recombinante*	1-16 mM
Tryptophane	*E.coli*	0-12 μm
urée	*Bacillus sp.*	0.55-550 μm
Ethanol	*S. ellipsoideus*	0.02-50 mM
Sucrose	*S. cerevisiae*	3.2 μM
Biocapteurs microbiens à bioluminescence et fluorescence		
Hg^{2+}	*E. coli*	0.2 ng/g
Polluants/toxicité	*E coli*	dépends du toxique
Arsenite	*E. coli*	-
DBO	*P. putida*	0.5 mg/l

Tab. 1.3 – Quelques exemples de biocapteurs à base de microorganismes

1.4 Les méthodes d'immobilisation

Dans un biocapteur, l'élément biologique est fixé au proche contact du transducteur ce qui permet une détection immédiate et très sensible du processus de reconnaissance moléculaire. De plus, l'immobilisation du bio-composé augmente sa stabilité et permet une réutilisation éventuelle du biocapteur. Plusieurs modes d'immobilisation de l'élément biologique peuvent être envisagés (voir figure 1.10).

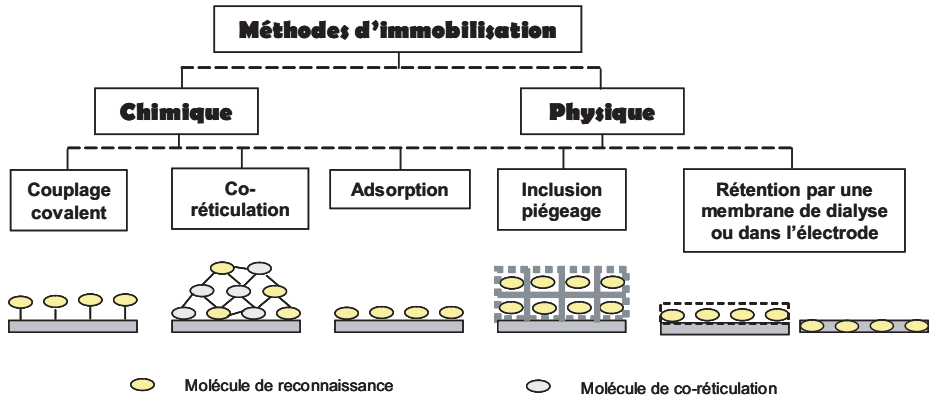


FIG. 1.10 – Représentation schématique des différentes méthodes d'immobilisation de l'élément biologique

1.4.1 Emprisonnement physique

Les méthodes d'emprisonnement physique sont généralement utilisées pour immobiliser les cellules entières et notamment les micro-organismes en raison de leur taille relativement grande en comparaison des protéines. On peut les retenir dans des gels d'agar ou de polyacrylamide, mais également par l'intermédiaire des membranes de dialyse ou de filtration, telles que les membrane Millipore 0,22 μm en ester cellulosique. On peut citer aussi l'immobilisation des cellules entières dans une suspension de collagène traitée par du glutaraldéhyde [Min91].

1.4.2 Adsorption

L'immobilisation par adsorption à un support insoluble représente une méthode très douce d'immobilisation. Cette technique a surtout été utilisée pour l'immobilisation d'enzymes.

Le procédé consiste à mélanger ensemble l'enzyme et le matériau servant de support dans des conditions appropriées. Après un certain temps d'incubation, la partie insoluble est séparée de la partie soluble par centrifugation ou filtration. L'inconvénient principal de cette méthode est que l'enzyme n'est pas fermement liée au support. Par exemple, l'adsorption des enzymes sur une matrice insoluble tel que du DEAE-sephadex est principalement due à de multiples liaisons saline. Des changements des conditions expérimentales telles que le pH, la concentration ionique, la température et le type de solvant peuvent causer la désorption de l'enzyme du support en affectant ces liaisons [Woo85].

1.4.3 Liaison covalente

Cette méthode a été surtout utilisée avec les enzymes. Le couplage covalent pour l'immobilisation des enzymes se base sur la formation de liaison covalente entre les molécules d'enzymes et le support. Il est important que les acides aminés essentiels à l'activité catalytique de l'enzyme (notamment ceux du site actif) ne soient pas impliqués dans le couplage covalent au support. Étant donné la difficulté de réaliser ceci, les enzymes immobilisées par cette méthode perdent généralement une partie de leurs activités. Ce problème peut être évité si l'enzyme est immobilisée en présence de son substrat - une étape du procédé qui tendrait à avoir un effet protecteur sur le site catalytique de l'enzyme pendant l'immobilisation. Avant le couplage covalent de l'enzyme sur le support, ce dernier doit être activé. Une fois activé, le support peut alors réagir avec les groupes réactifs de l'enzyme [Woo85].

1.4.4 Réticulation

La liaison par réticulation représente un type d'immobilisation au cours duquel les protéines (enzymes, proteines membranaires dans le cas de cellules entières...) sont

liées entre elles par des liaisons covalentes au moyen d'agents de réticulation (glutaraldéhyde, acide bis-diazobenzidin-2,2'-disulfure). Les enzymes liées par réticulation peuvent être préparées par 3 moyens différents :

1. la réticulation des molécules d'enzyme avec le glutaraldéhyde (qui forme des agrégats insolubles) ;
2. l'adsorption d'enzyme sur la surface accompagnée par une réticulation ;
3. l'imprégnation de matières poreuses avec des enzymes suivie par une réticulation des enzymes directement dans les pores.

Dans ce travail nous avons principalement utilisé la méthode de co-réticulation au glutaraldéhyde qu'on va décrire d'une façon plus détaillée ci-dessous.

1.4.4.1 La réticulation au glutaraldéhyde

Parmi l'arsenal de réactifs et des procédures de couplage, le glutaraldéhyde (GA) joue un rôle crucial dû à sa fiabilité et sa facilité d'utilisation. En effet, le GA est le réactif de choix dans plusieurs cas nécessitant une immobilisation rapide et sûre de protéines. De plus, il est peu coûteux, aisément disponible et facile à utiliser.

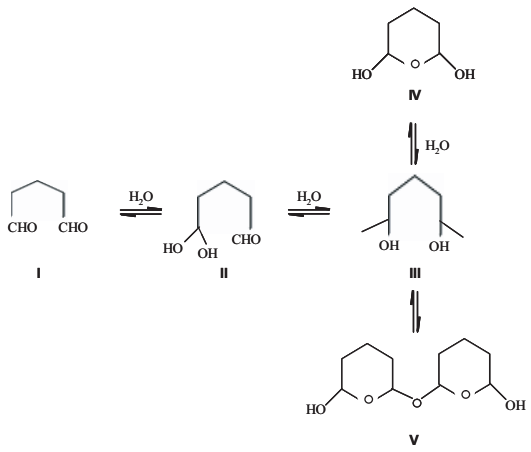


FIG. 1.11 – Les structures de GA dans une solution acqueuse

Il a été montré [DW94] que la solution aqueuse commerciale de GA (25 ou 70%) représente un mélange de plusieurs formes de ce réactif. Ces différentes structures du GA dans l'eau sont présentées dans la figure 1.11 : GA libre (**I**), forme linéaire mono

(**II**) et dihydrates (**III**), hémi-acétal cyclique (**IV**) et oligomères(**V**). Ces différentes formes de GA dépendent des conditions de solution. Dans les solutions acides et neutres le GA existe comme monomère en sa forme d'aldéhyde libre, hydraté ou hémi-acétal. À des concentrations élevées il polymérise pour former des oligomèriques hémi-acétals. Toutes ces formes de GA peuvent réagir avec des protéines de différentes manières et mener à leurs immobilisations. Walt *et al.* [DW94] ont proposé les produits du couplage avec le GA selon la forme dans laquelle il se trouve (voir figure 1.12). Dans les conditions standards, le GA subit des condensations d'aldol pour former des aldéhydes multimériques insaturés.

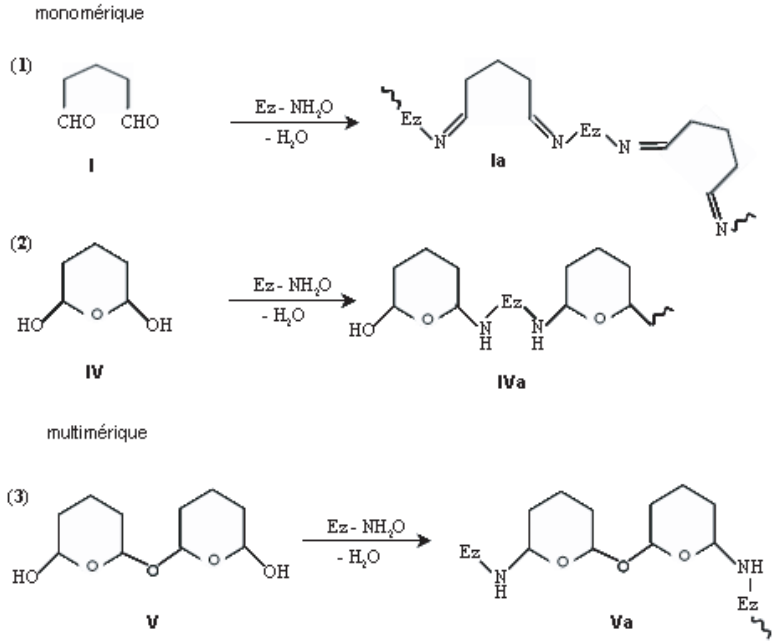


FIG. 1.12 – Les réactions de différentes formes de GA avec les enzymes

Dans certains cas, la protéine immobilisée est plus active et/ou plus stable que la protéine libre, ou la même protéine immobilisée par n'importe quelle autre méthode. Ceci peut se produire parce que les liaisons multiples, présumés pour se produire avec le GA, empêchent le déploiement de la protéine. Alternativement, la nature polymèrique du GA forme une longue chaîne, attachant la protéine à la matrice, qui permet une plus grande flexibilité pour les changements conformationnels de la

protéine nécessaire à son activité [SLB95]. De plus, l'utilisation d'une protéine inactive, tel que la sérum bovine albumine (BSA), avec enzyme et le GA (co-réticulation) permet, grâce à une meilleure répartition des masses des différentes protéines, une meilleure maîtrise de l'activité enzymatique sans altérer les propriétés mécaniques des membranes obtenues.

Ainsi, le glutaraldéhyde a été largement utilisé pour le développement de différents biocapteurs, sous sa forme liquide [ASMA00] ou vapeur [DSC02, ADS$^+$01, LZF$^+$99, MDB$^+$06].

1.5 Conclusion

Les nouvelles normes européennes relatives au contrôle et la préservation des milieux naturels de la pollution, ainsi que les exigences de plus en plus prononcées relatives au contrôle et au suivi de différentes espèces d'intérêt médical (glucose, urée,...) ou agro-alimentaire (sucres, éthanol, acide lactique...) ont contribué au développement des biocapteurs comme outils de choix pour répondre à ces exigences. Plusieurs équipes de recherches travaillent sur le développement de différents biocapteurs : enzymatiques, microbiens, immunologiques... Les performances des biocapteurs développés dépendent fortement du choix du couple biorécepteur-transducteur. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'utilisation des microélectrodes conductimétriques comme transducteurs pour le développement de nos biocapteurs enzymatiques ou microbiens pour les nombreux avantages qu'ils offrent : petite taille, faible coût, facilité d'utilisation, possibilités de miniaturisation...

Les microélectrodes interdigitées et les mesures conductimètriques

Sommaire

2.1 Introduction 43
2.2 Principe Général 44
2.3 Les microélectrodes 46
2.3.1 Fabrication 46
2.3.2 Les microélectrodes utilisées 47
2.3.3 Nettoyage des électrodes 49
2.4 Caractérisation des électrodes interdigitées 49
2.4.1 L'impédance à l'interface 49
2.4.2 Model de circuit équivalent des électrodes interdigitées 51
2.5 Déroulement des mesures avec les microélectrodes 53
2.5.1 Montage expérimental des mesures conductimètriques 53
2.5.2 Conditions de mesure 56
2.6 Conclusions 56

Chapitre 2

Les microélectrodes interdigitées et les mesures conductimètriques

2.1 Introduction

Depuis le succès qu'ont rencontré les biocapteurs comme outils analytiques attrayants et performants, le nombre de transducteurs développés pour leur mise en oeuvre a significativement augmenté. Seulement, en comparaison des autres types d'électrodes (potentiométriques tels que les ISFETs, ampérométriques,...), l'utilisation des microélectrodes interdigitées reste relativement peu étendue. Le suivi de la conductance d'une solution a été à la base utilisé comme moyen de détermination des vitesses de réaction. En effet, ces transducteurs permettent de mesurer les changements de conductance dus à la migration d'ions. Étant donné que plusieurs réactions enzymatiques ont comme conséquence un changement de la concentration totale d'ions elles sont bien adaptées pour leur utilisation en tant qu'élément sensible pour le développement de biocapteurs conductimètriques. Ainsi, ces dernières années plusieurs publications sont apparues traitant de l'utilisation de ces microélectrodes pour la détection de métaux lourds comme dans les travaux de Chouteau *et al.* [CDDC05] et Tuan *et al.* [ADP$^+$06], de pesticides comme dans les travaux de Dzyadevich *et al.* [DSC02, DSS$^+$94], du glucose comme dans les travaux de Soldatkin *et al.* [SEJ$^+$94] et de S. V. Dzyadevich *et al.* [DAS$^+$98] ou de l'urée comme dans les travaux de Lee *et*

al. [LKK$^+$00]... De plus, certains articles passant en revue le développement de biocapteurs conductimètriques comme celui de Dzyadevych *et al.* [DAE$^+$01] qui constitue une revue des microélectrodes enzymatiques permettant l'analyse de l'activité catalytique de l'enzyme pour son substrat ou de son inhibition par l'analyte, ont été publiés.

Dans ce chapitre nous allons présenter le principe de fonctionnement des capteurs conductimètriques, la méthode de fabrication des électrodes interdigitées et leur mise en oeuvre pour le développement de biocapteurs.

2.2 Principe Général

La conductivité électrique des solutions est, comme on l'a expliqué auparavant, directement liée à la présence de charges électriques mobiles, constituées par l'ensemble des ions dans la solution. En effet, la conductivité des liquides est le résultat de la dissociation de la substance dissoute, l'électrolyte, en ions et la migration de ces derniers sous l'effet d'un champ électrique. En présence du champ électrique, les électrolytes se dissocient pour donner des ions ou des groupes d'ions. Quand l'électrode est soumise à une différence de potentiel, un champ électrique se crée dans l'électrolyte ce qui provoque le mouvement de ces ions (les anions sont attirés par l'anode alors que les cations vont vers la cathode (voir figure 2.1).

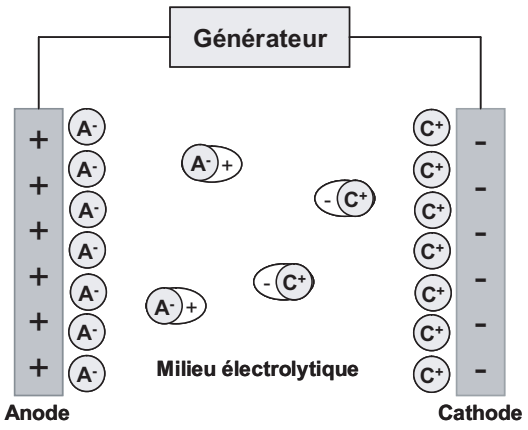


FIG. 2.1 – Migration des ions dans la solution et conductivité de l'électrolyte

Ainsi, le courant dans l'électrolyte est provoqué par le mouvement des ions vers les électrodes où ils sont neutralisés en atomes neutres (ou molécules) [DAES06]. Il est connu que la conductance électrique G d'un corps, inverse de sa résistance, est proportionnelle à la surface S de la section perpendiculaire à la direction du courant et inversement proportionnelle à sa longueur l :

$$G = \frac{\gamma S}{l}$$

avec :

G : Conductance (Siemens)

γ : conductance spécifique ou conductivité, caractéristique du corps ; elle est exprimée en siemens par centimètre lorsque la surface est donnée en cm^2 et la longueur en cm.

S : Surface de la section

l : longueur de la section

Suite à tout ce qui a été présenté ci-dessus, on peut conclure que la mesure conductimètrique, en général, consiste en la détermination de la conductivité de la solution entre deux électrodes parallèles, sa valeur étant la somme des conductivités données par tous les ions dans la solution en question. La mesure de conductance ne peut être effectuée en courant continu, car il se produirait alors une polarisation des électrodes et une électrolyse entraînant une variation de résistance. Il est donc indispensable de réaliser la mesure en courant alternatif de fréquence suffisamment élevée pour éliminer ces effets perturbateurs. Par conséquent, il est nécessaire d'abord d'élucider les phénomènes provoqués par l'application d'un courant alternatif sinusoïdal dans la cellule électrolytique et à l'interface métal-solution en étudiant les paramètres conditionnant la conductivité de la solution, pour développer le système expérimental de mesure. C'est ce qu'on va aborder dans le paragraphe suivant.

2.3 Les microélectrodes

Différents types de microélectrodes ont été développés : des microdisques, des microsphères, des microcylindres, des microbandes,... Chaque type a un comportement spécifique même si elles ont toutes les même propriétés. L'association de plusieurs microélectrodes de la même famille en des réseaux s'est également avérée intéressante [Mor96]. Parmi ces réseaux, les microbandes interdigitées (figure 2.2) ont été utilisées dans divers domaines [DSP+94].

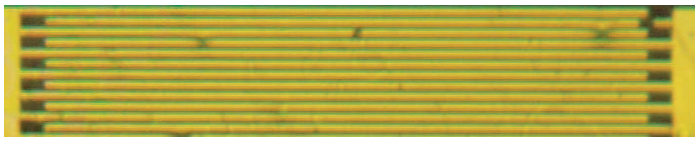


FIG. 2.2 – Photo des bandes interdigitées prise en microscopie optique

L'intérêt de cette géométrie, par rapport à d'autres microélectrodes, réside dans le fait que l'ordre de grandeur du courant stationnaire est augmenté par l'association de plusieurs microbandes. Ces électrodes sont constituées de bandes parallèles alternativement interconnectées entre elles afin d'avoir alternativement une anode et une cathode [Fer97]. Cette géométrie est généralement formée de bandes de quelques dizaines de microns séparées par des espacements de quelques microns. Ceci permet à l'espèce générée sur l'une des bandes d'être reconsommée à la bande suivante. Ces électrodes interdigitées permettent aussi d'augmenter la surface de contact pour la biomembrane.

2.3.1 Fabrication

Dans ce travail, on a utilisé un système de deux paires d'électrodes sur une seule puce (voir figure 2.3). Cette configuration permet de travailler en mode différentiel.

De plus, l'utilisation d'électrodes interdigitées permet d'augmenter la surface de contact pour la biomembrane. La fabrication des électrodes commence généralement par la préparation du substrat (silicium [PPH01], verre [DSC02], céramique (AlO_3) [ADS+01]...). Un masque est utilisé pour définir les motifs dans lesquels la couche mince de chrome puis le film de métal (platine ou or) seront pulvérisés. Ensuite,

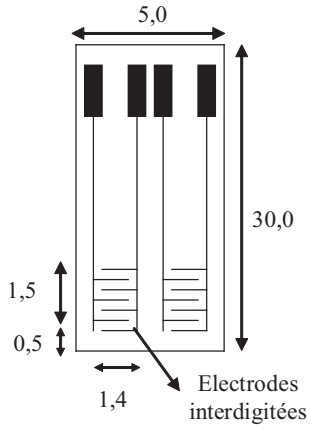


FIG. 2.3 – Les Électrodes interdigitées

la technique lift-off permet d'enlever la résine après le 'sputtering'. Enfin les capteurs sont découpés en chip [Mai04]. Pour développer nos biocapteurs, deux types d'électrodes interdigitées ont été utilisés et sont présentés dans le paragraphe suivant.

2.3.2 Les microélectrodes utilisées

2.3.2.1 Les microélectrodes interdigitées en platine

Ces capteurs conductimétriques utilisés sont composés de deux paires identiques d'électrodes interdigitées en platine sur substrat de verre fabriquées à l'Institut de Chemo et Biosensorics (Münster, Allemagne). Les deux paires d'électrodes interdigitées en platine de 150 nm d'épaisseur sont déposées sur un substrat en Pyrex.

Une couche intermédiaire de Ti de 50 nm d'épaisseur est utilisée pour améliorer l'adhésion du platine sur le substrat. La largeur des doigts constituant les électrodes interdigitées, ainsi que la distance entre elles est de 10 μm alors que leur longueur est d'environ 1 mm, ce qui permet d'avoir une surface sensible sur chacune des 2 électrodes d'environ 1 mm^2 [DSC02, CDCD04]. Pour définir la partie sensible du capteur, la partie centrale du capteur a été couverte de résine en époxyde (voir figure 2.4).

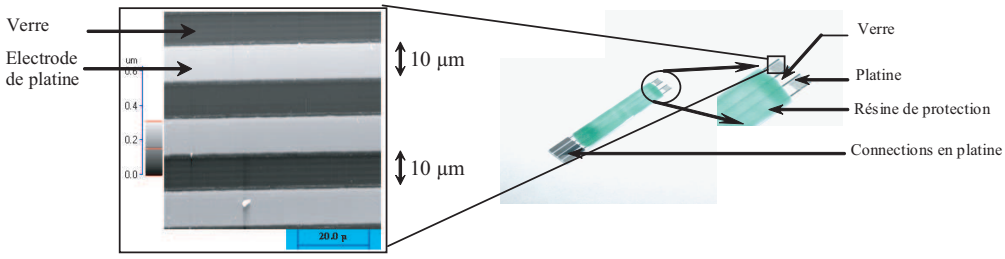


FIG. 2.4 – Photo du capteur conductimètrique en platine

2.3.2.2 Les microélectrodes interdigitées en Or

Ces électrodes conductimètriques de 0,5 mm d'épaisseur et de dimensions 5×30 mm sont aussi formés par deux paires identiques d'électrodes interdigitées. Ces électrodes diffèrent des précédentes du fait qu'elles sont en or et qu'elles ont été fabriquées par dépôt sur un substrat en céramique (AlO_3) à l'Institute of Semiconductors Physics, Kiev, Ukraine (Fig. 2.5). Une couche intermédiaire de chrome (0,1 nm d'épaisseur) a été employée pour une meilleure adhérence de l'or. Chaque doigt de l'électrode est de 20 nm de large et 1mm de long, avec un espacement de 20 nm également entre les doigts. La partie sensible de chacune des deux électrodes est d'environ 1×1,5 mm [ADS+01].

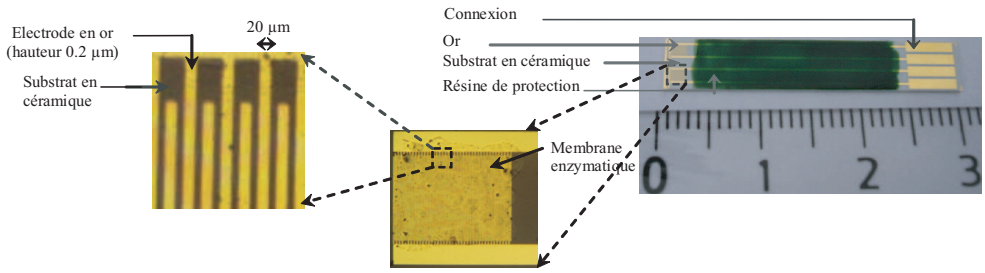


FIG. 2.5 – Vue générale des microélectrodes interdigitées en Or

2.3.3 Nettoyage des électrodes

Avant leur utilisation, les électrodes sont nettoyées avec de l'acide sulfo-chromique (1 ml de H_2SO_4 concentré auquel on ajoute une goutte d'une solution saturée aqueuse de $K_2cr_2o_7$) puis rincées avec de l'eau ultrapure et séchées à la température ambiante.

2.4 Caractérisation des électrodes interdigitées

La compréhension de la nature de l'impédance à l'interface de l'électrolyte-métal est très importante pour comprendre le principe de base de fonctionnement des capteurs conductimètriques. L'approche clé dans ce système est l'interprétation des processus physiques et chimiques qui y ont lieu sous forme d'un circuit électrique équivalent comprenant les différents éléments électriques : les condensateurs et les résistances électriques, qui vont simuler les phénomènes en question.

2.4.1 L'impédance à l'interface

Quand un métal (électrode) est placé dans un électrolyte (dans lequel les charges sont transportées par le mouvement des ions), une interface électrique est immédiatement développée. A cause de la distribution hétérogène des charges à cette interface, un potentiel est généré. En 1679, Helmholtz avait suggéré que la différence de potentiel apparaît entre deux couches de charges électriques de polarité différente. Une couche de charges située sur la surface du métal et l'autre, de charge égale et opposée, juste à l'intérieur de l'électrolyte. Il y a donc une "double couche" de charge à l'interface qui se comporte tout comme un condensateur parallèle plat. Cette capacité d'interface a été appelée la capacité de "double couche", C_{dl}.

Cependant, quelques charges passent à travers la double couche sous l'effet des réactions électrochimiques qui ont lieu. Une telle fuite de charge induit une résistance de "transfert de charge", R_{ct} dont l'expression est dérivée de l'équation de Butler-Volmer et, pour de petites amplitudes de signal appliquées, est donnée par :

$$R_{ct} = \frac{RT}{nFi_0} \tag{2.1}$$

où :
- R : Constante des gaz parfaits
- T : Température ($^{\circ}$K)
- Constante de Faraday
- n : nombre d'électrons impliqués dans la réaction au contact de l'électrode
- i_0 : la densité du courant de transfert.

La diffusion régulière des ions du milieu électrolytique vers l'interface provoque une augmentation de l'impédance de l'interface métal/électrolyte, notamment dans le domaine des basses fréquences. Cependant, si la fréquence d'excitation est élevée ces ions ne peuvent pas suivre l'oscillation du champ et l'impédance de diffusion tend vers zéro. En 1899, Warburg décrit l'impédance de diffusion appelée aussi impédance de "Warburg" Z_W :

$$Z_W = (1-j)\frac{\sigma}{\omega^{\frac{1}{2}}} \tag{2.2}$$

où :
- ω : fréquence angulaire (sec^{-1})
- σ : coefficient de diffusion (Ω $sec^{-0.5}$).

L'impédance de diffusion est en série avec la résistance de transfert de charge et les deux sont en général en parallèle avec la capacité de double couche (voir figure 2.6).

Ce circuit constitue le modèle de circuit équivalent pour l'impédance d'interface le plus utilisé. La diffusion et le transfert de charge sont classés comme des processus faradiques puisqu'ils obéissent à la loi de Faraday alors que le chargement de la capacité de la double couche est un processus non faradique. Il apparaît à partir de l'équation 2.2 que l'impédance de diffusion n'autorise pas le passage du courant

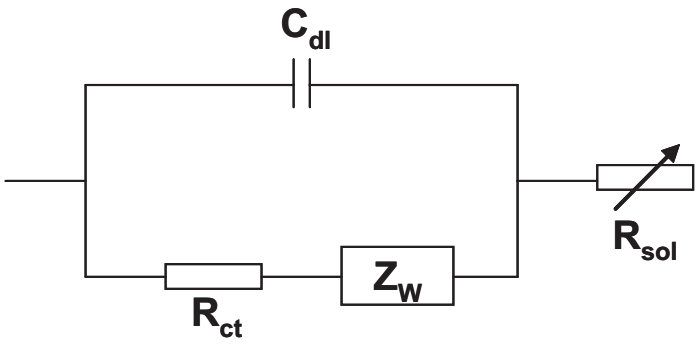


FIG. 2.6 – Modèle de circuit équivalent de l'impédance d'interface

continu, vu qu'elle tend vers l'infini quand ω approche de zéro.

2.4.2 Model de circuit équivalent des électrodes interdigitées

Comme on l'a déjà présenté dans le paragraphe 3.3.2, les transducteurs conductimètriques utilisés dans ce travail se constituaient d'une paire d'électrodes interdigitées (en or ou en platine) déposées sur un substrat en verre ou céramique.

La caractérisation de ce transducteur a été développée dans le travail de S.V. Dzyadevich [Dzy92]. Ainsi, le modèle de circuit équivalent, des électrodes immergées dans un électrolyte, présenté sur la figure 2.7 a été établi.

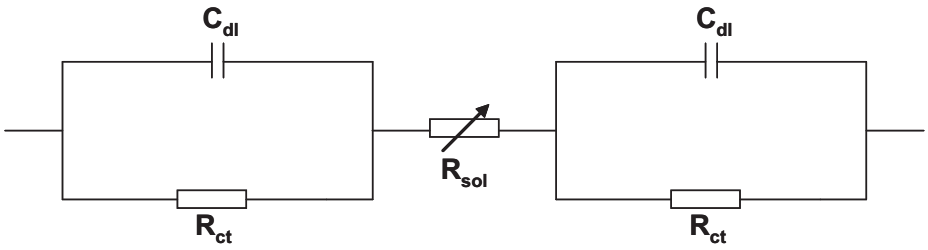


FIG. 2.7 – Modèle de circuit équivalent des électrodes interdigitées

En effet, à des fréquences supérieurs à 10 KHz, l'impédance de diffusion Z_W peut être négligée et l'impédance totale du système consiste principalement en la résistance de la solution d'électrolyte, la capacité de la double couche et la résistance de transfert

de charge. Étant donné qu'on travaille à 100 KHz ce modèle convient parfaitement à notre système. L'impédance totale du système peut être décomposée en :

$$Z = Z_r + Z_c \tag{2.3}$$

avec :
- Z_r : composante résistive de l'impédance
- Z_c : composante capacitive de l'impédance.

La composante résistive de l'impédance totale est mesurée en phase par rapport au signal d'excitation tandis que la composante capacitive est mesurée en quadrature par rapport au signal d'excitation. La représentation selon le diagramme de Nyquist de l'impédance du système, sur une gamme de fréquence suffisamment haute pour négliger l'impédance de Warburg, est schématisée sur la figure 2.8.

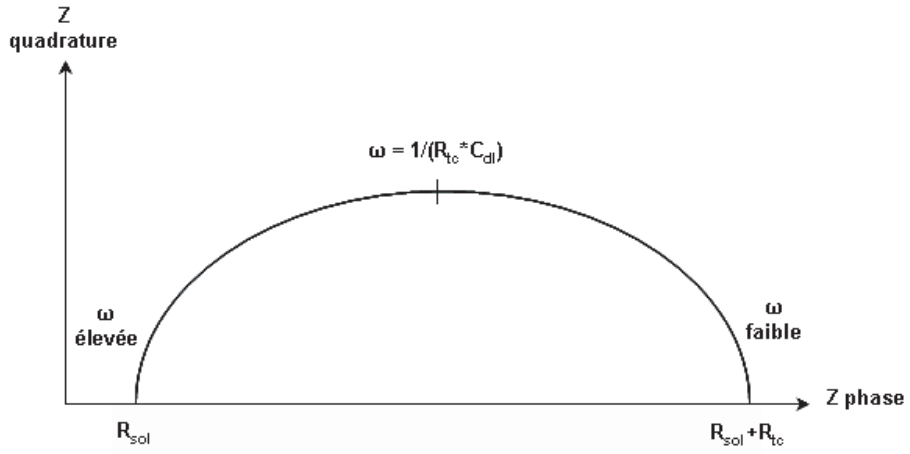


FIG. 2.8 – Diagramme d'impédance du montage conductimètrique

De plus, les travaux de S. Dzyadevych ont permis de montrer que dans le domaine des hautes fréquences, la valeur de l'impédance n'est pas affectée par la résistance de transfert de charge R_{ct}. Dans ce domaine de fréquence, l'impédance en phase est égale à la résistance de la solution. L'intensité du signal en phase est égale à :

$$I = \frac{U_{excitation}}{Z_{phase}} = \frac{U_{excitation}}{R_{sol}} = E_{excitation} * G \tag{2.4}$$

où : G est la conductance exprimée en Siemens (S)

Dans notre système de mesure, les électrodes interdigitées sont recouvertes par la membrane bioactive (enzyme et/ou micro-organisme) pour l'électrode de mesure et par une membrane de référence (BSA et/ou micro-organisme non actif). La R_{sol} sera en fait, la résistance d'une de ces membranes. Par ailleurs, les intensités sont directement converties en une tension (U_{out}) au niveau de la détection synchrone (convertisseur courant/tension) aux bornes de la résistance de charge $R_{circuit}$:

$$I = \frac{U_{out}}{R_{circuit}} \tag{2.5}$$

En substituant I dans l'équation 2.4 par son équivalent dans l'équation 2.5 on obtient :

$$\frac{U_{out}}{R_{circuit}} = U_{excitation} * G \dashrightarrow U_{out} = U_{excitation} * G * R_{circuit} \tag{2.6}$$

Ce qui donne :

$$G = \frac{U_{out}}{U_{excitation} * R_{circuit}} \tag{2.7}$$

2.5 Déroulement des mesures avec les microélectrodes

2.5.1 Montage expérimental des mesures conductimètriques

Le montage expérimental utilisé pour la mesure de conductivité au laboratoire est schématisé dans la figure 2.9. Il permet une mesure différentielle entre une électrode de travail et une électrode de référence.

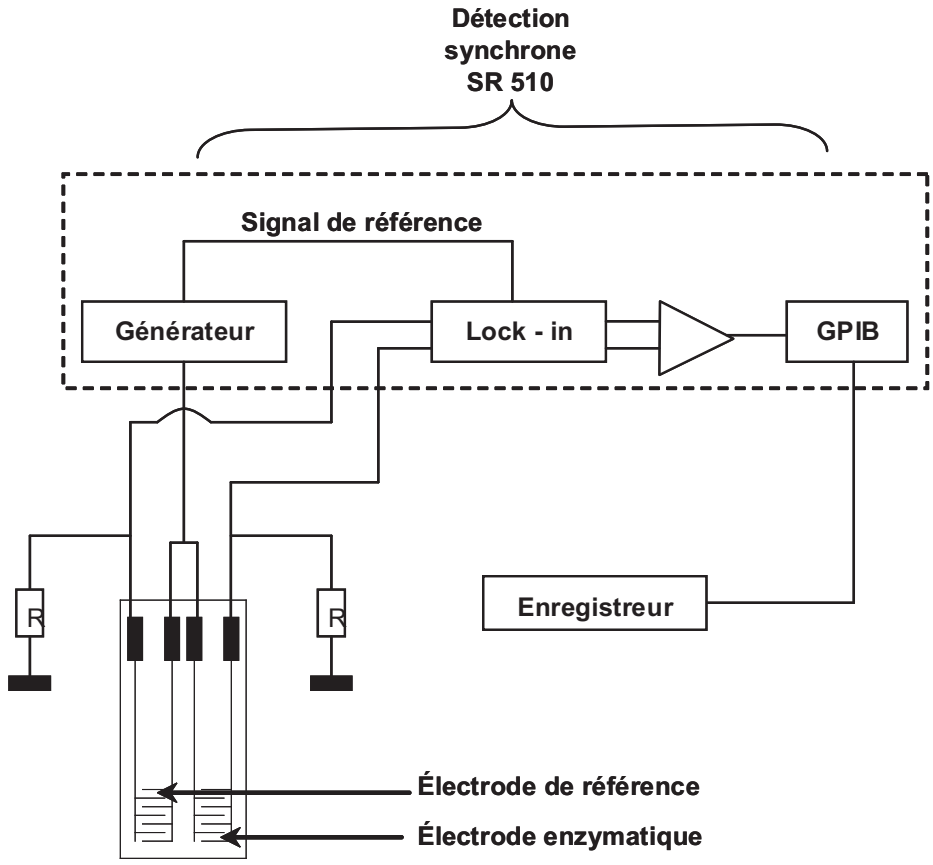


FIG. 2.9 – Montage de la mesure conductimètrique

Comme on l'a expliqué plus haut, la conductance totale de notre système est directement proportionnelle à U_{out} (équation 2.7). Sachant que $U_{excitation}$ appliquée a été de 10 mV et que $R_{circuit}$ est de 100 ohm, on obtient en remplaçant, dans l'équation 2.7, $R_{circuit}$ et $U_{excitation}$ par leurs valeurs, la valeur de conductance correspondante G.

La détection Synchrone SR 510 de Stanford Research (figure 2.10) permet de fixer la phase à laquelle est mesurée le signal de sortie. En effet, la détection synchrone est utilisée chaque fois que l'on veut isoler un signal sinusoïdal en phase avec une sinusoïde de référence. Ainsi, le signal sinusoïdal de référence généré est transmis à l'électrode excitatrice de chaque paire. Les signaux sont ensuite filtrés par la technique du lock-in.

FIG. 2.10 – Photo du lock-in Amplifier SR 510

Cette technique permet de filtrer un signal avec une bande passante arbitrairement faible centrée sur la fréquence du signal d'excitation [Auv]. Les signaux ainsi recueillis sont transmis à la détection synchrone qui fait la différence des deux signaux (électrode de référence et électrode de travail). Cette mesure en mode différentiel permet de neutraliser tous les signaux non spécifiques liés, par exemple, à l'adsorption d'espèces chargées sur l'électrode. La différence de tension (dans notre cas de figure, proportionnelle avec un coefficient 1, à la différence de conductance) est transmise à un enregistreur (voir photo du dispositif de mesure, figure 2.11).

FIG. 2.11 – Vue Générale du dispositif de mesure conductimétrique

2.5.2 Conditions de mesure

Les mesures conductimètriques ont été effectuées en appliquant à chaque paire d'électrodes interdigitées une tension alternative de petite amplitude (10 mV) avec une fréquence de 100 kHz. Ces mesures ont été effectuées à température ambiante (sauf pour les expériences faisant intervenir l'effet de la température) dans un volume de 5 ml de tampon phosphate (KH_2PO_4, NaCl) 5 mM, pH 7,4, agité magnétiquement. Après atteinte d'une ligne de base stable du signal de sortie, l'analyte est ajouté au milieu.

2.6 Conclusions

Dans ce chapitre, nous avons présenté le principe de mesures conductimètriques faisant intervenir des électrodes interdigitées. La méthode de fabrication de ces microélectrodes a été aussi synthétiquement expliquée.

Ces transducteurs conductimètriques offrent plusieurs avantages :
- Ils sont produits à grande échelle et à faible coût ;
- ils ne nécessitent pas d'électrode de référence ;
- ils ne sont pas sensibles à la lumière ;
- ils sont de petite taille ;
- ils offrent de nombreuses possibilités de miniaturisation.

Tout ces avantages favorisent leur exploitation avantageuse au développement de différents biocapteurs électrochimiques comme nous allons le voir dans les chapitres suivants.

Développement d'un biocapteur conductimétrique pour le dosage des protéines dans les eaux naturelles

Sommaire

3.1 Introduction 59

3.2 Matériels et méthodes 60

3.2.1 Matériels 60

3.2.2 Immobilisation de l'enzyme 60

3.2.3 Stockage 61

3.2.4 Préparation des échantillons d'eaux naturelles 61

3.3 Développement et optimisation du biocapteur 62

3.3.1 Conditions optimales 62

3.3.2 Caractéristiques analytiques du biocapteur obtenu 64

3.3.3 Tests préliminaires sur des échantillons d'eau 66

3.4 Application du biocapteur à protéinase K immobilisée au contrôle de la qualité de l'eau 67

3.4.1 Vérification des caractéristiques du biocapteur 67

3.4.2 Application à l'analyse des eaux de rivières 68

3.5 Conclusions et perspectives 70

Chapitre 3

Développement d'un biocapteur conductimétrique pour le dosage des protéines dans les eaux naturelles

3.1 Introduction

Aujourd'hui, l'environnement et sa protection sont devenus une des préoccupations les plus importantes des populations et de leurs dirigeants. Ainsi, l'Union européenne lui consacre une bonne place dans ses textes législatifs, notamment dans la directive 2000/60/CE sur l'eau, transposée en France par la loi ordinaire 2004-338. Dans ce contexte, on éprouve un besoin de plus en plus urgent de maîtriser et de contrôler les hydrosystèmes et notamment la zone d'interface entre les eaux superficielles et les eaux souterraines (zone hyporhéique). Toutefois, sa localisation et la nature transitoire des processus d'assimilation rendent cette unité hyporhéique peu étudiée car elle nécessite la conception de nouveaux moyens d'investigation non destructifs et non perturbateurs. Les méthodes analytiques actuelles ne permettent pas de suivre en continu la dynamique des rejets sur le milieu (cause brève mais à fort impact sur le milieu). Les micro-capteurs in situ possèdent les qualités requises pour suivre ces processus d'assimilation hyporhéique à travers la mesure en continu de la teneur en

MO (Matière Organique assimilable par les organismes vivants) des milieux aquatiques hyporhéiques. Or, il existe 3 types de composés organiques qui peuvent être utilisés pour le suivi de l'assimilation : les lipides (10-40% de la MO oxydable), les glucides (10-15%) et les protéines (20-30%). Parmi ces trois paramètres, la teneur en protéines semble constituer un bon indicateur d'activité hyporhéique [Nam99]. Or les méthodes d'analyses classiques des protéines, parmi lesquelles les plus répandues sont celles basées sur la colorimétrie, peuvent être sensibles à des paramètres autres que la quantité absolue de protéines (par exemple, la méthode utilisant le bleue de Coomassie dépend de la fixation du colorant sur les résidus lysine et arginine ; La méthode du biuret, même si elle est indépendante de la composition en acides aminés, elle est relativement peu sensible et peut donner des résultats différents selon la pureté de l'échantillon). C'est dans ce contexte qu'on a cherché, dans le cadre d'une action concertée avec le Ministère de la recherche (projet MicaProt) avec le Cemagref de Lyon, à concevoir des biocapteurs utilisant des protéases immobilisées pour installer un système de surveillance in situ et en temps réel de la qualité de l'eau. La protéine BSA (Bovine Sérum Albumine) a été choisie en premier temps comme protéine de référence pour le travail de développement du biocapteur enzymatique.

3.2 Matériels et méthodes

3.2.1 Matériels

L'enzyme protéinase K (Tritirachium album), EC 3.4.21.64, lyophilisée, 37 U/mg protéines et l'albumine de sérum bovin (BSA) ont été fournis par Sigma. Le glutaraldéhyde utilisé (grade II, 25 % en solution aqueuse) est fourni par Acros Organics.

3.2.2 Immobilisation de l'enzyme

Pour la détection de protéines, une enzyme : la protéinase K a été immobilisée au contact direct de l'électrode. La protéinase K appartient à la classe des endopeptidases à sérine. Cette protéase a été choisie en raison de son activité protéolytique forte sur les protéines dénaturées mais aussi natives et pour sa gamme de pH optimum étendue ([EHK$^+$74]). L'hydrolyse des protéines au contact de l'enzyme produit des peptides et/ou des acides aminés libres chargés (figure 3.1) ce qui provoque un changement de

la conductivité locale au niveau de la membrane enzymatique.

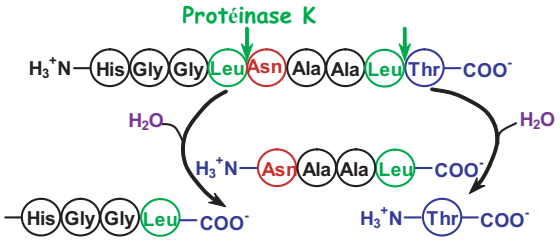


FIG. 3.1 – Représentation schématique de l'hydrolyse catalysée par la protéinase K

La détection enzymatique a été rendue possible grâce à l'immobilisation de l'enzyme sur la surface de l'électrode. Ainsi, on a réalisé une co-réticulation avec de l'albumine de sérum bovin (BSA) dans une vapeur saturée en glutaraldéhyde.

Pour cela, un mélange de 4% de protéinase K et 6% de BSA a été préparé dans du tampon phosphate 20 mM pH 7.5, avec 10% de glycérol. Pour effectuer la mesure en mode différentiel on a préparé deux électrodes : une électrode de travail avec à sa surface la membrane enzymatique et une électrode de référence avec juste un mélange de 10% glycérol et 10% BSA dans le tampon phosphate. Dans une deuxième étape, une dilution par deux des deux types de membrane a été testée pour voir l'effet sur la stabilité du biocapteur. Ensuite, les capteurs ont été placés dans une atmosphère saturée en glutaraldéhyde. Après écoulement du temps d'exposition, les membranes sont séchées à l'air libre pendant 15 à 30 minutes.

3.2.3 Stockage

Les biocapteurs sont préparés et puis stockés, entre les différentes expériences, à 4°C dans du tampon phosphate 5 mM, pH 7,4.

3.2.4 Préparation des échantillons d'eaux naturelles

Les échantillons d'eau de rivière prélevés sont filtrés à l'avance à l'aide d'un filtre de 0,45 μm pour éliminer les micro-organismes et les composés insolubles. L'élimination des micro-organismes est importante pour améliorer la stabilité des caractéristiques physico-chimiques des échantillons pendant la durée des expériences.

3.3 Développement et optimisation du biocapteur

Cette première série d'expériences a été effectuée avec les électrodes interdigitées en platine sur substrat de verre fabriquées à l'Institut de Chemo et Biosensorics de Münster en Allemagne.

3.3.1 Conditions optimales

Le temps d'exposition aux vapeurs de glutaraldéhyde (ou temps d'immobilisation) conditionne la qualité de réponse du biocapteur. En effet, pour les temps courts, les liaisons entre les groupements amines des protéines et le glutaraldéhyde ne sont pas suffisantes pour stabiliser l'enzyme et pour obtenir une membrane assez résistante. Par contre, pour des temps longs, la forte réticulation de l'enzyme peut conduire à son inactivation ou réduire l'accessibilité de son site actif au substrat. C'est pourquoi, comme on peut le voir sur la (figure 3.2), on obtient un optimum de réponse pour un temps d'exposition avec la vapeur de glutaraldéhyde de l'ordre de 20 minutes.

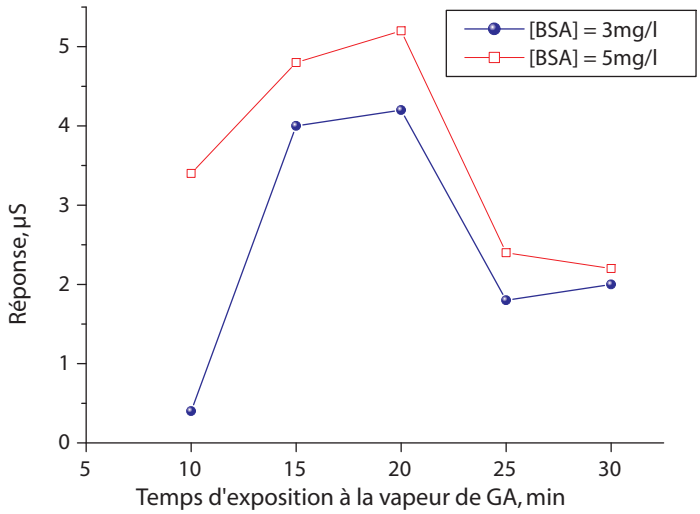
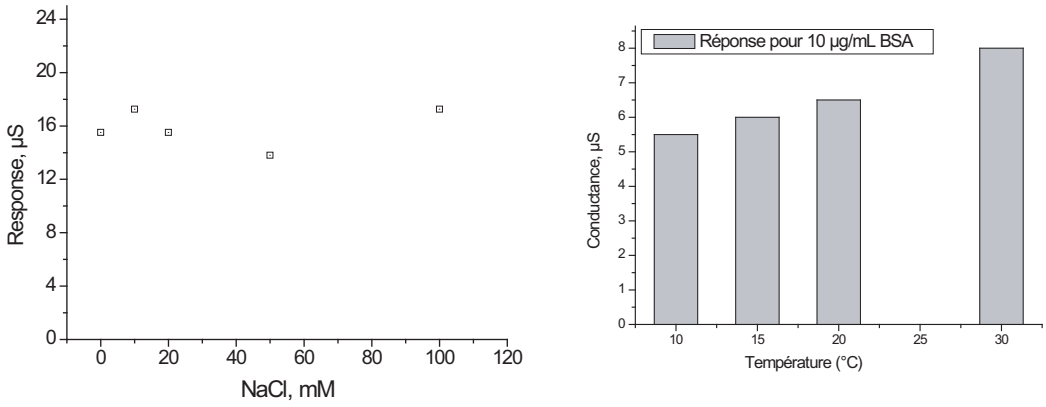


FIG. 3.2 – Effet du temps d'exposition à la vapeur de glutaraldéhyde sur la réponse du biocapteur

Il faut noter qu'avec 4% de protéinase K et 6% de BSA, on a observé une mauvaise

tenue de la membrane enzymatique. Pour cette raison, une dilution par deux des deux types de membranes a été testée pour diminuer l'épaisseur de la membrane et améliorer ainsi son adhérence sur le capteur. L'adhérence de la membrane a été fortement améliorée.

L'effet de l'addition de sel sur la réponse de biocapteur a été également examiné. Comme le montre la figure 3.3a, il n'y a pas d'effet significatif de l'addition du sel sur la réponse du biocapteur. En effet, le mode différentiel des mesures permet d'éliminer les effets de variation de charge non spécifiques tel que l'addition de sel dans le milieu de mesure.



(a) (b)

FIG. 3.3 – Effets du sel (a) et de la température (b), sur le réponse du biocapteur

De plus, Étant donné que le biocapteur à base de protéinase K est destiné à l'utilisation in situ pour le contrôle en continu de la concentration de protéines en tant qu'indicateur de matière organique et donc de pollution urbaine, il était important d'étudier l'effet de la température sur sa réponse, la température de l'eau changeant entre les différentes saisons. Comme nous pouvons le voir sur la figure 3.3b, la réponse du capteur enzymatique dépend de la température. Jusqu'à 30°C la réponse augmente avec la température c'est pourquoi pour une analyse rigoureuse, la température doit être prise en considération. Ainsi, l'effet de la température pourra être corrigé en employant ces résultats. De plus, l'étude de la réponse du biocapteur au cours du temps a montré une stabilité de stockage de plus de 30 jours (figure 3.4).

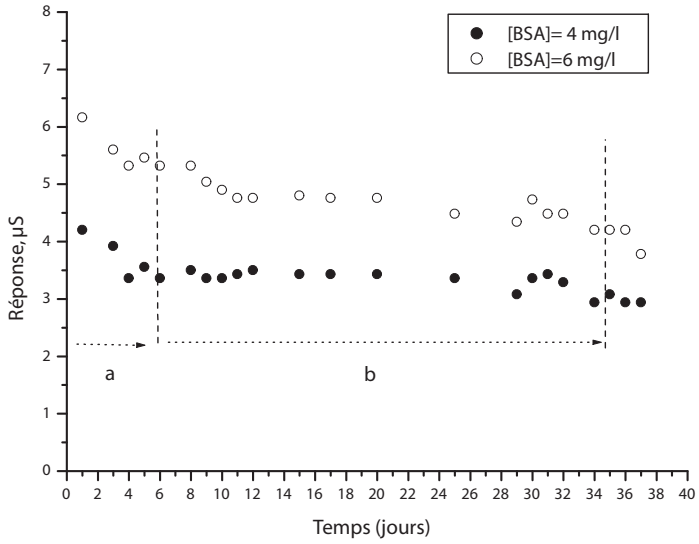


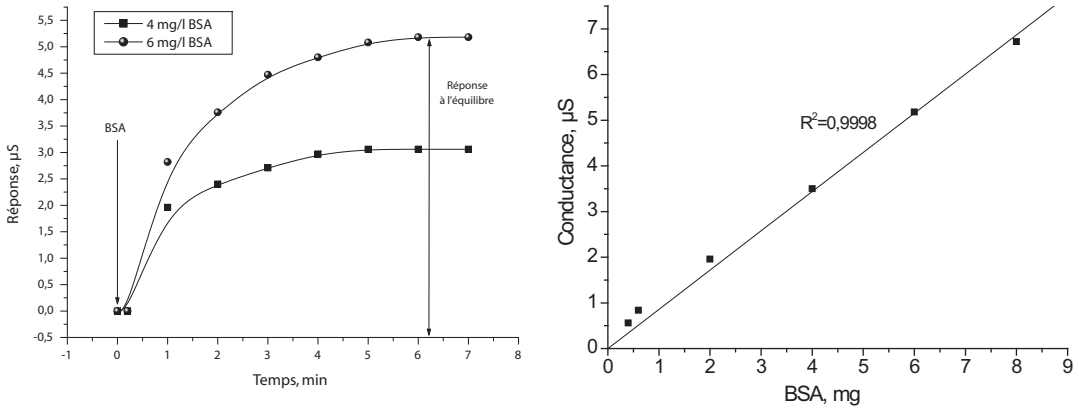
FIG. 3.4 – Étude de la stabilité du biocapteur au cours du temps

3.3.2 Caractéristiques analytiques du biocapteur obtenu

Une réponse typique du biocapteur au BSA, en fonction du temps est représentée sur la (figure 3.5a). Après stabilisation du signal (obtention d'une ligne de base stable) dans du tampon phosphate, l'injection de l'analyte (4 ou 6 mg/L) dans le milieu conduit à une variation significative du signal. La réponse à l'équilibre (utilisée pour nos mesures) est obtenue quand on arrive à un signal stable due au phénomène d'équilibre qui se crée entre le taux de production d'ions, résultat de la réaction enzymatique à l'intérieur de la membrane, et le flux de transfert d'ions apportés par les molécules du tampon, qui diffusent dans la membrane. On obtient une stabilisation du signal au bout d'une durée inférieure à 8 minutes ce qui veut dire qu'on peut faire 7 à 10 mesures par heure.

Après toutes les optimisations, la courbe de calibrage du biocapteur a été établie. Comme le montre la figure 3.5b, la gamme de réponse linéaire du biocapteur correspond à des concentrations de BSA allant de 0,4 à 8 mg/l avec une sensibilité de l'ordre de 0,88 μS/mg BSA. Cette gamme de réponse est bien en adéquation avec les valeurs des vraies concentrations des protéines dans les eaux naturelles [Nam99]. De plus ce biocapteur offre une gamme de détection plus large et pour des concentrations plus

faibles que celle que couvre le capteur ampèrométrique conçue par P. Sarkar [Sar00] (entre 0,25 et 2,5 g/L de BSA).



(a) (b)

FIG. 3.5 – (a) Réponse typique en fonction du temps du biocapteur à protéines (b) Courbe de calibrage du biocapteur en fonction de la concentration de BSA

La reproductibilité des mesures données par le biocapteur a été également étudiée. Comme le montre la figure 3.6, une reproductibilité élevée (de l'ordre de 3 %) a été obtenue.

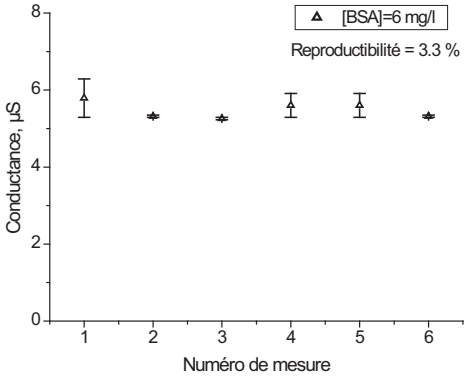
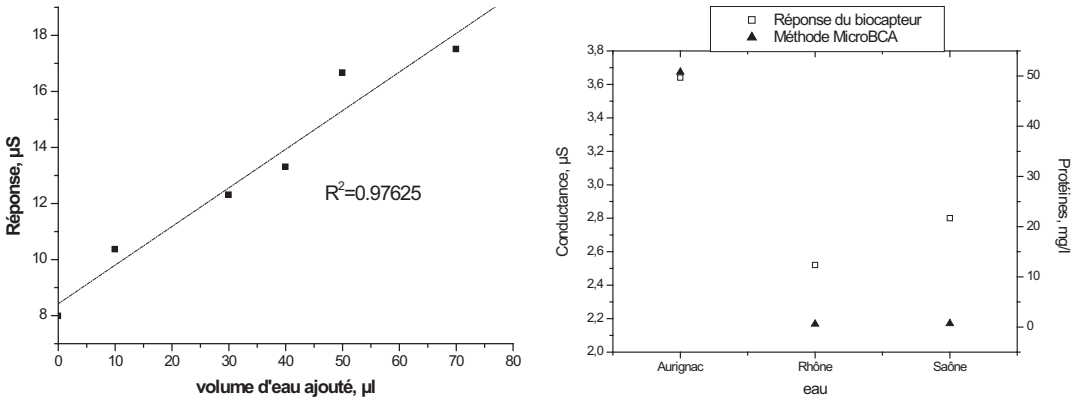


FIG. 3.6 – Etude de la reproductibilité du biocapteur

3.3.3 Tests préliminaires sur des échantillons d'eau

Pour étudier la performance du biocapteur obtenu dans la détection des protéines dans l'eau de rivière, deux échantillons d'eaux (Rhône, Saône) et une eau à la sortie d'une station d'épuration (Aurignac) ont été prélevés avec l'aide du Cemagref de Lyon. En premier lieu, on a commencé par mesurer la réponse du biocapteur suite à l'addition de 8 mg/L BSA puis on a ajouté des volumes croissants d'eau d'Aurignac pour voir s'il existe d'éventuels effets d'activation ou d'inhibition de l'enzyme (et par conséquent du biocapteur) sous l'action de quelques molécules de polluants.

Comme le montre la fig. 3.7a, une réponse proportionnelle au volume d'eau d'Aurignac ajouté a été obtenue, ce qui montre bien qu'il n'y a aucun effet significatif d'inhibition ou d'activation des contaminants de l'eau.



(a) (b)

FIG. 3.7 – (a) Test de l'effet de l'eau sur la réponse du biocapteur (b) Comparaison de la réponse du biocapteur avec les valeurs données par la microBCA

Ensuite, les trois échantillons d'eau ont été analysés par une méthode traditionnelle de dosage des protéines qui est la microBCA (à base d'acide bicinchroninic pour la détection et la quantification colorimétrique des protéines totales dans les solutions aqueuses diluées) [SKH$^+$85]. Les concentrations en protéines données sont comparées aux valeurs de réponse du biocapteur (figure 3.7b). Les deux méthodes sont en accord dans la classification des trois eaux en terme de concentration en protéines : l'eau la plus concentrée étant celle d'Aurignac (microBCA : 50,8 mg/L) puis l'eau de la Saône (microBCA : 0,7 mg/L) et finalement l'eau du Rhône (micro BCA : 0,6 mg/L) donnant

respectivement des valeurs de conductance de 3,65, 2,8 et 2,5 μS.

Cette comparaison uniquement qualitative montre aussi que la BSA ne peut pas être employée comme étalon pour la détermination de la concentration en protéines dans les eaux naturelles. En effet, les protéines des eaux sont différentes en taille et en nature ce qui intervient dans la manière dont Elles sont hydrolysées et analysées par le biocapteur ; en comparaison la BSA est une protéine complexe et de taille assez importante. Faisant suite à cette première partie, on tend à établir une calibration du biocapteur à l'aide de plusieurs échantillons d'eaux naturelles pour une détermination rigoureuse des concentrations des protéines dans l'eau.

3.4 Application du biocapteur à protéinase K immobilisée au contrôle de la qualité de l'eau

Suite à une interruption d'approvisionnement des électrodes interdigitées de platine préalablement fournies par l'Institut de Chemo et Biosensorics de Münster en Allemagne ; nous avons utilisé pour la suite de cette étude et pour toutes les parties qui vont suivre ce travail, les électrodes interdigitées en or fabriquées à l'Institut of Semiconductors Physics de Kiev en Ukraine. Comme nous allons le voir, les résultats obtenus avec les deux types d'électrodes sont comparables.

3.4.1 Vérification des caractéristiques du biocapteur

La réponse du biocapteur, réalisé comme décrit dans le paragraphe 3.2 sur les nouvelles électrodes interdigitées en or, en fonction de la concentration en BSA est présentée sur la figure 3.8. Ainsi, en comparaison aux résultats obtenus avec les électrodes en platine, l'ordre de grandeur de la réponse est comparable. La gamme linéaire pour la détermination de BSA a légèrement changé en passant de l'intervalle entre 0,4 à 8 mg/L à celui entre 0,8 à 6 mg/L. De plus, l'analyse statistique de la réponse du biocapteur après plusieurs répétitions selon la méthode AFNOR[1] XP T90-210 ont montré une bonne reproductibilité, une répétabilité constante et une limite de détection d'environ 0,5 mg/L de BSA.

[1]AFNOR SAGAWEB, 1999. Norme XP T90-210. AFNOR, 11-20.

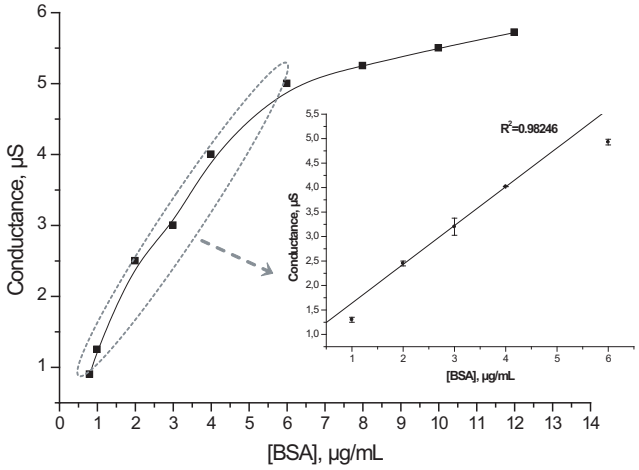


FIG. 3.8 – Courbe de calibration de la BSA avec les électrodes interdigitées en or

3.4.2 Application à l'analyse des eaux de rivières

Après étude des caractéristiques conductimétriques du capteur avec la protéinase K immobilisée, nous avons examiné les réponses du biocapteur en question suite à l'addition de quelques échantillons d'eau prélevés en des points différents de la rivière près de Lyon (Rize aval D112, Rize aval pont de Cusset, canal de Jonage, Rhône Fessine, Chaudanne drain, Chaudanne aval Leclerc, Yzeron pont de Chabrol).

Comme on l'a signalé précédemment, au départ l'idée était de rapporter la réponse du biocapteur, après injection d'eau de rivière (diluée au besoin), sur la courbe d'étalonnage de la BSA pour obtenir la concentration en protéines dans l'échantillon. Cependant, les expériences ont montré que la BSA ne peut pas être employée comme étalon pour la détermination de la concentration de protéines dans les eaux de rivière (paragraphe 3.3.3).

C'est pour cette raison que les échantillons d'eaux de rivières ont été additionnellement analysés à l'aide de méthodes d'analyses classiques pour les comparer avec les valeurs données par le biocapteur.

3.4.2.1 Comparaison avec le carbone organique total (COD)

Étant donné que les protéines servent d'indicateur de la matière organique dans les effluents nous avons commencé par la comparaison de la réponse du biocapteur avec les valeurs de carbone organique dissous (COD) fournis par le Cemagref. Les résultats sont présentés sur la figure 3.9.

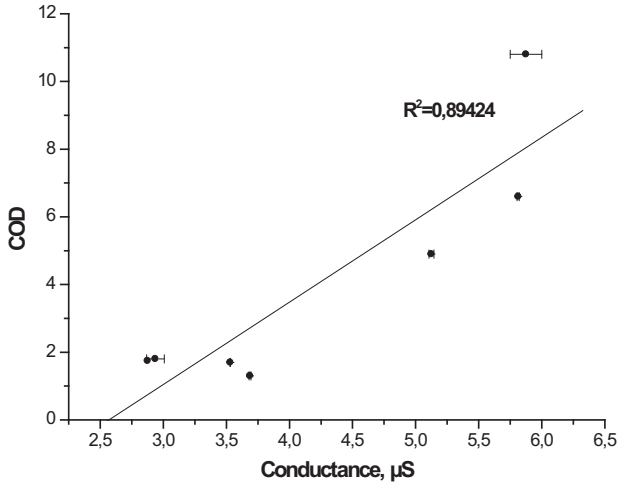


FIG. 3.9 – Comparaison de la réponse du biocapteur avec les valeurs de COD

Comme on peut le voir, une corrélation linéaire entre le COD et la conductance donnée par le biocapteur a été obtenue. Ceci confirme bien que les protéines constituent un bon estimateur de la matière organique dans les eaux de rivière.

3.4.2.2 Comparaison avec la concentration en protéines totales déterminée par la méthode classique microBCA

Áfin de vérifier la validité des mesures effectuées par le biocapteur développé, nous avons réalisé un dosage des protéines à l'aide d'une méthode colorimétrique classique : la microBCA. Les résultats sont présentés sur la figure 3.10. Une bonne corrélation a été obtenue. Cependant, il y a un petit écart dû à une sensibilité moindre de la méthode classique pour les basses concentrations en protéine.

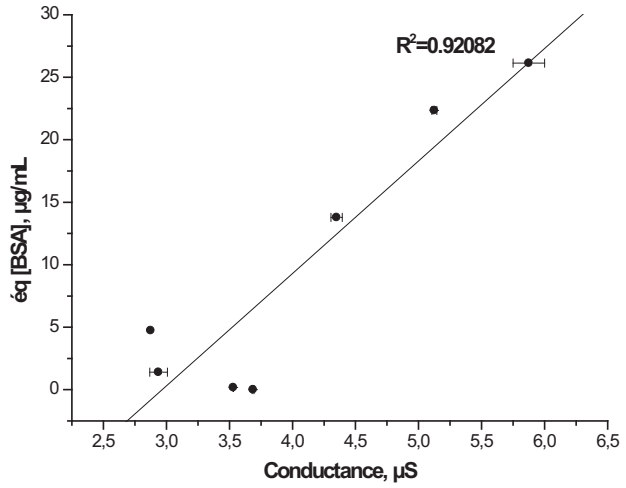


FIG. 3.10 – Comparaison de la réponse du biocapteur avec les valeurs données par la microBCA

3.5 Conclusions et perspectives

Le biocapteur conductimétrique avec la protéinase K immobilisée semble offrir des potentialités importantes pour la détection des protéines dans les eaux naturelles. En effet, la gamme de dosage, entre 0,8 à 6 mg/L, est en adéquation avec les gammes moyennes de concentrations observées en milieu naturel [Nam99]. De plus, ce biocapteur montre une bonne reproductibilité (3,3%), une répétabilité constante et une limite de détection d'environ 0,5 mg/L BSA. Le temps de réponse est suffisamment rapide (valeurs à l'équilibre de 7 à 8 minutes).

L'étude de l'effet de la température sur la réponse du biocapteur a montré la capacité du biocapteur à travailler à des températures basses (10^oC) ce qui est très important pour son utilisation sur site (fluctuations de la température de l'eau selon les saisons). De plus, la stabilité élevée du biocapteur au cours du temps (supérieure à 1 mois) a été montrée.

La confrontation des réponses du biocapteur après l'injection de différents échantillons d'eaux de rivière de la région Lyonnaise avec les valeurs de carbone organique dissous

et les teneurs en protéines déterminés par une méthode colorimétrique classique (la microBCA protein Assay) ont montré de bonnes corrélations, preuves de la fiabilité du biocapteur conductimètrique dans le dosage des protéines dans les eaux naturelles.

En perspectives, on se propose de :

- Tester l'immobilisation de plusieurs protéases en même temps sur les électrodes (par exemple ajout de la trypsine et de la pronase en plus de la protéinase K) pour essayer d'améliorer encore les caractéristiques analytiques du biocapteur (hydrolyse plus efficace de l'ensemble des protéines).
- Mieux préparer ces biocapteurs à l'utilisation in situ en ajoutant une protection physique autour de la membrane enzymatique (par exemple en instaurant un système de tube dans lequel le capteur est protégé avec acheminement de l'échantillon à l'aide d'un système de pompes. Cette étude sera confiée à une société spécialiste dans le développement et la commercialisation de capteurs, intéressée par la commercialisation de notre biocapteur.

Développement d'un biocapteur conductimètrique pour le dosage du lactose dans le lait

Sommaire

4.1 Contexte 75
4.2 Introduction 76
4.3 Matériels et méthodes 76
4.3.1 Matériels 76
4.3.2 Immobilisation des enzymes 77
4.3.3 Stockage 78
4.3.4 Préparation des échantillons de lait 78
4.4 Résultats et discussion 79
4.4.1 Dosage du lactose 79
4.4.2 Étude de la stabilité du biocapteur 80
4.4.3 Étude des éventuelles interférences avec le glucose 81
4.4.4 Dosage du lactose dans le lait 82
4.5 Conclusions et perspectives 83

Chapitre 4

Développement d'un biocapteur conductimètrique pour le dosage du lactose dans le lait

4.1 Contexte

La conception de ce biocapteur a vu le jour suite à l'idée de mettre au point un biocapteur hybride utilisant la glucose oxydase et la bactérie *Herminiimonas arsenicoxydans* dont le gène codant pour la β-galactosidase est induit par le sélénium (présenté dans le chapitre 5. En effet, avant de développer ce biocapteur complexe, on a voulu d'abord vérifier si la combinaison entre les activités catalytiques de ces deux enzymes (la glucose oxydase et la β-galactosidase) sur le lactose permet d'avoir une variation de charge suffisante pour être mesurée avec les électrodes conductimètriques. De plus, étant donné que le lactose est quantitativement le sucre le plus important du lait, il est intéressant d'avoir des outils de contrôle en continu et en temps réel de ce sucre que ce soit pendant le processus de fabrication (des laits pauvres en lactose pour les personnes intolérantes à ce sucre, par exemple) ou pour le contrôle qualité de la matière première.

4.2 Introduction

En plus de constituer une source d'énergie, le lactose aide le corps à absorber les sels minéraux. Malheureusement il existe chez certaines personnes une intolérance au lactose due à un déficit congénital ou acquis en une enzyme, la lactase, spécifique de la muqueuse (couche de cellules recouvrant l'intérieur des organes creux) de l'intestin. Plusieurs travaux utilisant différents systèmes enzymatiques se sont intéressés au développement de biocapteurs pour la détermination du lactose. La majorité de ces biocapteurs se basent sur des électrodes ampèrométriques sur lesquelles on a immobilisé deux enzymes (glucose oxydase et β-galactosidase dans des films de Langmuir-Blodgett [SSM$^+$04]), trois enzymes (horseradish peroxidase, glucose oxidase and β-galactosidase dans des films de $Nafion$® [LYS$^+$97]) ou même trois enzymes et le ferrocène (glucose oxidase, β-galactosidase et mutarotase dans la β-cyclodextrin [LLY$^+$98]). Cependant aucun biocapteur pour le lactose se basant sur un transducteur conductimètrique n'existe. De plus, plusieurs des biocapteurs existants sont sensibles à plusieurs sucres en même temps [MKND05] et ne permettent donc pas d'obtenir sélectivité vis à vis du lactose. Ainsi, dans ce travail, on s'est intéressé au développement d'un biocapteur bi-enzymatique utilisant la glucose oxydase (GOx) associée à la béta-galactosidase pour le dosage du lactose (réactions enzymatiques mises en jeu présentées sur la figure 4.1). On essaiera d'éliminer les interférences avec le glucose en immobilisant sur l'électrode de référence un mélange de glucose oxydase et de BSA. Ensuite, des tests avec des échantillons réels de lait commercial ont été effectués.

4.3 Matériels et méthodes

4.3.1 Matériels

La glucose oxidase (GOD) (EC 1.1.3.4, 130 U/mg) est un don généreux du laboratoire de Biomolecular Electronics, IMBG, Kiev, Ukraine. L'albumine de sérum bovin (BSA), le lactose et le glucose ont été fournis par sigma ainsi que le glutaraldehyde, grade II, 25% en solution aqueuse.

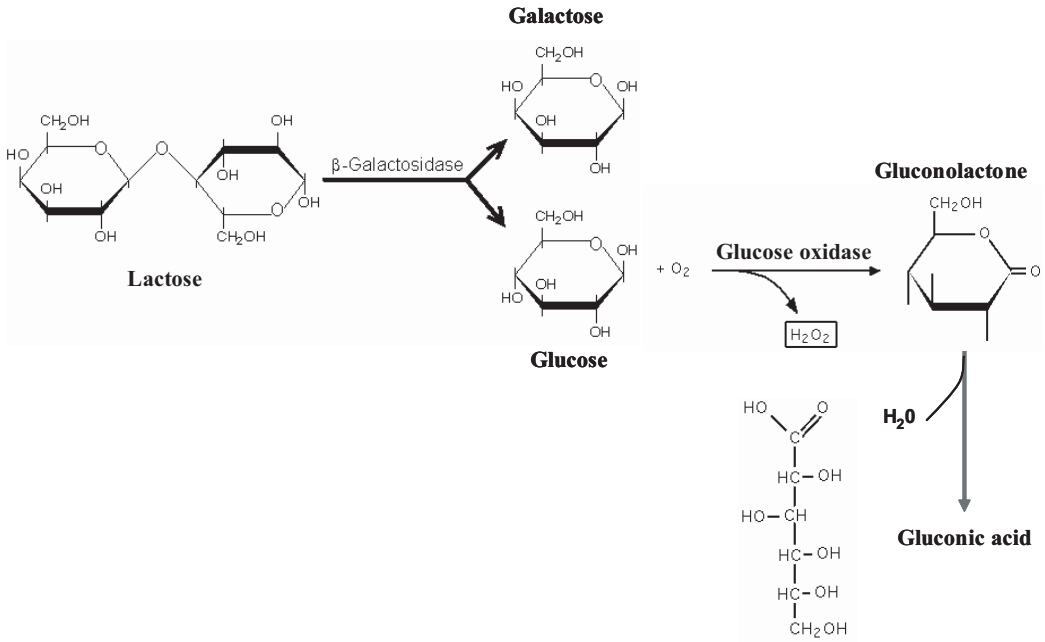


FIG. 4.1 – Réactions enzymatiques catalysées par la β-galactosidase et la glucose oxydase

4.3.2 Immobilisation des enzymes

L'immobilisation des deux enzymes : la glucose oxydase (GOD) et la β-galactosidase (βGal) se fait en deux étapes (voir figure 4.2) :

1- Un mélange contenant 5% GOD (w/w), 5 % BSA et 10% glycérol dans du tampon phosphate 20 mM pH 7,4, a été préparé. 0,2 μL de cette solution enzymatique est ensuite déposée sur les parties sensibles des électrodes de travail et de référence. Le capteur est ensuite placé dans une atmosphère saturée en glutaraldéhyde pendant 30 minutes afin de permettre la co-réticulation de l'enzyme avec la BSA.

2- Une solution A (mélange contenant 5% βGal (w/w), 5 % BSA et 10% glycérol dans du tampon phosphate 20 mM pH 7,4) a été préparée. 0,2 μL de cette solution est ensuite déposée sur l'électrode de travail contenant déjà la première couche de GOD. Sur l'électrode de référence, 0,2 μL de la solution B (10% de BSA et 10% glycérol toujours dans le même tampon phosphate) est déposée sur l'électrode de référence.

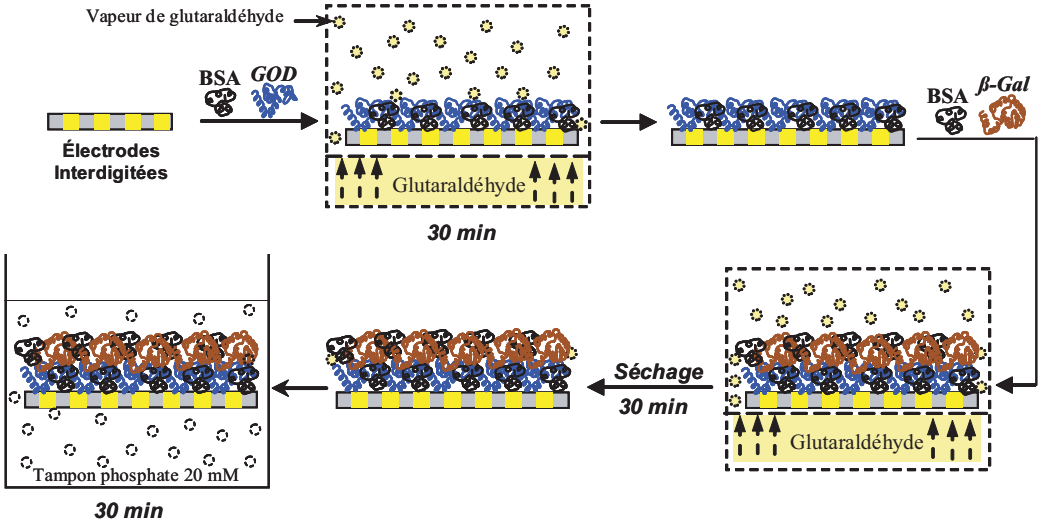


FIG. 4.2 – Représentation schématique des étapes d'immobilisation des deux enzymes sur le transducteur

4.3.3 Stockage

Les biocapteurs sont stockés, entre les différentes expériences, à 4°C dans du tampon phosphate 5 mM, pH 7,5.

4.3.4 Préparation des échantillons de lait

On a réparti des volumes de 1 mL de laits commerciaux dans des tubes eppendorf. Les tubes sont ensuite centrifugés puis le culot contenant les protéines insolubles ainsi que le surnageant contenant la matière grasse du lait sont éliminés. La partie médiane du tube, récupérée, est diluée deux fois puis conservée pour servir comme solution mère pour le dosage du lactose dans le lait à l'aide du biocapteur.

4.4 Résultats et discussion

4.4.1 Dosage du lactose

La réponse du biocapteur en fonction du temps pour le lactose est représentée sur la figure 4.3.

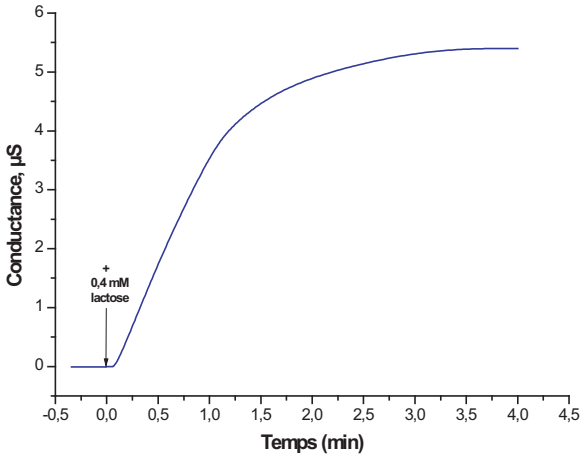
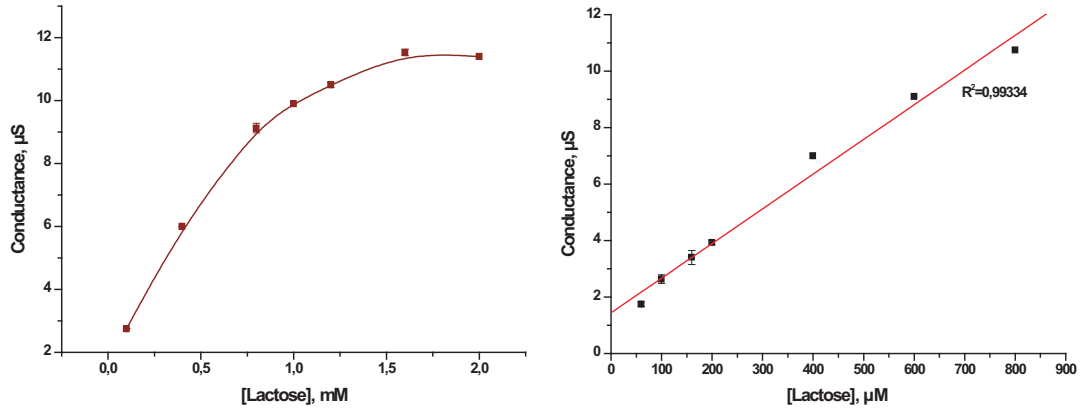


FIG. 4.3 – Réponse typique en fonction du temps du biocapteur après ajout du lactose

Comme on peut le voir, la réponse à la saturation du signal est obtenue au bout de 4 minutes maximum. Ainsi, le temps de réponse du biocapteur est très intéressant pour son utilisation pour des contrôles en temps réel.

La détermination de la réponse du biocapteur en fonction de la concentration du lactose nous a permis de tracer les courbes de calibrage présentées sur la figure 4.4. La partie (a) montre une saturation du biocapteur obtenue à partir de 1 mM de substrat. Ainsi, comme le montre la courbe (b), le biocapteur développé permet une calibration linéaire du lactose dans un intervalle de concentration allant de 60 à 800 μM (0,03 à 0,3 g/L). Cette gamme de détection est beaucoup plus basse que celles obtenues avec les biocapteurs enzymatiques développés par Amarita *et al.* [AFA97] et Sharma *et al.* [SSM+04].



(a) (b)

FIG. 4.4 – (a) Réponse du biocapteur en fonction de la concentration de lactose (b) Gamme linéaire de calibration du lactose

4.4.2 Étude de la stabilité du biocapteur

La figure 4.5 montre l'évolution, au cours du temps, de la réponse du biocapteur pour différentes concentrations de lactose.

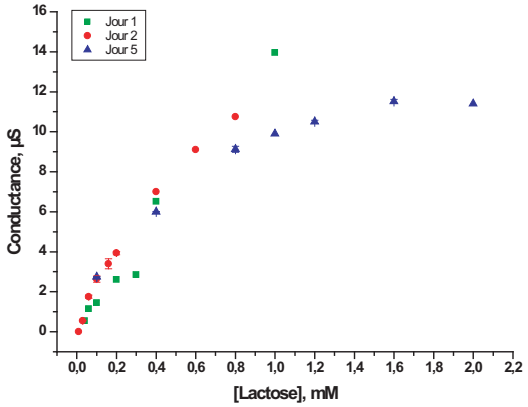


FIG. 4.5 – Évolution de la réponse du biocapteur au cours du temps

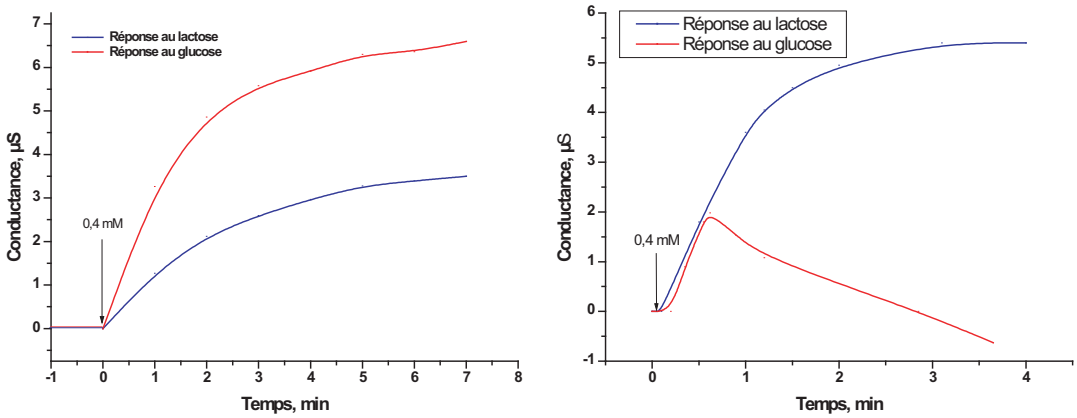
On remarque une diminution qui commence à être visible à partir du cinquième jour pour les concentrations les plus élevées de lactose (perte de 28,5 % de la réponse pour 1 mM de lactose en passant du jour 1 au jour 5). Cependant pour les teneurs plus

faibles en lactose (se situant dans la gamme linéaire), on a une variation négligeable de la conductance. Au-delà de 9 jours, une chute considérable de la réponse a été observée. Ainsi, il est préférable de remplacer les membranes enzymatiques au moins une fois par semaine.

4.4.3 Étude des éventuelles interférences avec le glucose

Comme on l'a présenté précédemment, on avait immobilisé la glucose oxydase sur les deux électrodes (de référence et de travail) pour n'avoir d'effet sur la conductance que suite à l'hydrolyse du lactose par la β-galactosidase immobilisée sur l'électrode de travail. L'effet du glucose doit être neutralisé par le mesure différentielle (hydrolyse par la glucose oxydase immobilisée sur les deux électrodes).

Pour vérifier ceci, on a préparé un biocapteur suivant les étapes décrites dans la section 4.3 sauf que dans l'étape 1 on a remplacé, sur l'électrode de référence, la membrane contenant la glucose oxydase par une membrane inactive (BSA). Les réponses de ce biocapteur pour le lactose et le glucose sont présentées dans la figure 4.6 (a).



(a) (b)

FIG. 4.6 – Réponse en fonction du temps pour le lactose et le glucose (a) du biocapteur sans la Gox dans la membrane de référence (b) du biocapteur avec la Gox dans la membrane de référence

On voit bien qu'on a une réponse importante pour le glucose et une réponse pour

le lactose. Pour le biocapteur dans lequel on a ajouté la GOD dans la membrane de référence (figure 4.6 (b)), on a juste un petit pic qui redescends rapidement. Ce pic peut être attribué au temps d'homogénéisation de la quantité de glucose arrivant sur chacune des deux électrodes. Ainsi, on voit bien que le biocapteur obtenu est bien sélectif au lactose. Il faut noter qu'il serait toujours possible d'utiliser le premier biocapteur (membrane de référence sans GOD) pour d'éventuelles applications nécessitant une estimation de la quantité de glucides (glucose inclu).

4.4.4 Dosage du lactose dans le lait

Deux échantillons différents de laits commerciaux (A et B) préalablement préparés comme décrit dans la section 4.3 et dilués 2 fois, ont été testés avec le biocapteur développé.

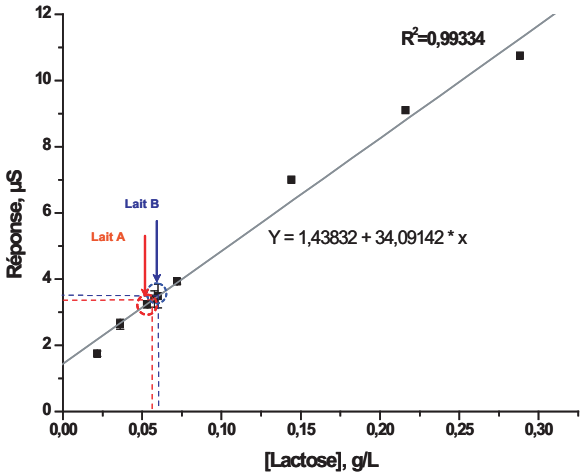


FIG. 4.7 – Détermination de la concentration de lactose dans des échantillons de laits commerciaux

En reportant les valeurs de conductances données par le biocapteur sur la droite de calibration du lactose (voir figure 4.7) on a trouvé les concentrations suivantes pour les échantillons A et B respectivement : 0, 053 et 0,0604 g/L. Le taux de dilution étant de 1/1000 (sans compter la légère concentration de départ du lait obtenue par l'élimination du surnagent de matière grasse et du culot de protéines après centrifugation), on a ainsi des concentrations de 53 et 60,4 g/L de lactose dans ces laits

commerciaux ce qui est en adéquation avec les valeurs réelles qui se situent aux alentours de 50 g/L.

4.5 Conclusions et perspectives

Le biocapteur conductimètrique développé pour le dosage du lactose a montré l'efficacité de l'association entre les activités enzymatiques de la β-galactosidase et la glucose oxydase pour l'obtention d'un signal conductimètrique exploitable.

Ce biocapteur présente une gamme linéaire de réponse se situant entre 60 et 800 μM. Son temps de réponse est rapide puisque, suite à l'injection du lactose, la stabilisation du signal de sortie (conductance) est atteinte en quelques minutes (4 minutes). Ceci permet une utilisation en temps réel pour le contrôle qualité dans des processus de fabrication par rapport à d'autres biocapteurs pour l'estimation du lactose dans le lait qui nécessitent plus de 50 minutes de temps d'analyse [AFA97].

Pour ce qui est de la stabilité du biocapteur, il est recommandé de changer les membranes enzymatiques toutes les semaines. Ceci ne pose pas de problèmes vu la facilité de mise en œuvre de ces membranes enzymatiques.

Les dosage du lactose dans des échantillons de lait commerciaux à l'aide du biocapteur développé montrent l'efficacité de ce dernier pour le suivi de la concentration de ce disaccharide.

La réussite du suivi des effets de charge, résultant de la combinaison de l'hydrolyse enzymatique du lactose par la β-galactosidase avec l'oxydation du glucose catalysée par la glucose oxydase, à l'aide des électrodes conductimètriques va être exploitée dans le chapitre suivant et appliquée au dosage du sélénium, en exploitant une β-gal induite dans les cellules bactériennes de *Herminiimonas arsenicoxydans* par la présence de sélénium.

Développement d'un biocapteur conductimètrique hybride à base de bactérie mutante et de glucose oxydase pour la détection du sélénite

Sommaire

5.1 Contexte et motivations 87

5.2 Matériels et méthodes 89

5.2.1 Réactifs utilisés 89

5.2.2 Caractéristiques de la souche bactérienne 90

5.2.3 Culture bactérienne 91

5.2.4 Immobilisation des enzymes puis des bactéries 92

5.2.5 Exposition des bactéries au sélenium 93

5.3 Résultats et discussion 94

5.3.1 Tests préliminaires et études des caractéristiques analytiques du biocapteur 94

5.3.2 Effets de la concentration en lactose utilisée sur la sensibilité du biocapteur 96

5.3.3 Comparaison des réponses du biocapteur obtenues selon le mode d'exposition au sélénium adopté 97

5.3.4 Dosage du sélénite après optimisation 98

5.4 Conclusions et perspectives 99

Chapitre 5

Développement d'un biocapteur conductimètrique hybride à base de bactérie mutante et de glucose oxydase pour la détection du sélénite

5.1 Contexte et motivations

Le sélénium (Se) est un élément naturellement présent dans la plupart des roches et sols. Le sélénium traité est principalement employé dans les industries d'électronique et du verre et comme composant des colorants pour plastiques, peintures, encres, et caoutchouc... Il est également employé comme additif alimentaire. Certains composés du sélénium sont très mobiles et fortement solubles dans l'eau ce qui implique une plus grande chance d'exposition à ces composés. Le sélénium peut contaminer l'eau de surface dans les eaux de drainage et d'irrigation. De plus, des études ont montré que le sélénium peut être stocké dans les tissus d'organismes aquatiques [RLW06] puis probablement concentré dans la chaîne alimentaire [Age03]. Bien que le sélénium soit un oligoélément indispensable à l'organisme, il devient toxique s'il dépasse une certaine dose. En effet, la prise excessive de sélénium peut causer

des effets néfastes sur la santé, qui sont généralement observés à des doses excédant 5 fois la dose alimentaire recommandée (RDA). La RDA actuelle pour le sélénium, établie par "The Food and Nutrition Board of the National Research Council" (National Academy of Sciences : NAS) est 55 μg/jour pour les adultes (approximativement 0,8 μg/kg/jour). Le niveau supérieur tolérable actuel selon le NAS de prise de sélenium (UL) est de 400 μg/jour (approximativement 5,7 μg/kg/jour. L'ingestion de quantités élevées de sélénium peut causer des problèmes gastro-intestinaux (vomissement, diarrhée), des altérations des cheveux et des ongles, et des manifestations neurologiques comprenant des acroparesthésies, faiblesse, convulsions, et une diminution de la fonction cognitive [RSL$^+$04, TZW$^+$02, Tin03, BZ05]. Pour toutes ces raisons, le contrôle de la concentration en sélénium est inclus dans la directive intégrée du contrôle préventif de la pollution (IPPC) de l'union européenne. Ainsi, plusieurs méthodes analytiques pour la quantification du sélénium ont été développées [GNLSR06, CFP$^+$06, MBMGSM06, VDB$^+$01]. La majorité de celles-ci impliquent la détection par spectrométrie d'absorption atomique [LGC97], par spectrométrie de masse [TXW05], ou par spectrométrie de fluorescence atomique [SLFC03]. Cependant, malgré les nombreux avantages qu'ils offrent (simplicité et rapidité des mesures qui n'exigent pas d'outils de laboratoire sophistiqués) très peu de méthodes à base de capteurs ont été développées pour la quantification du sélénium [LdB00, CM04]. Un seul biocapteur permettant une détection qualitative du sélénium se basant sur l'utilisation d'un papier chromatographique associé à l'inhibition de l'enzyme carboxyl estérase a été décrit [SK01].

Le sélénium est présent sous plusieurs formes redox, principalement les formes toxiques et solubles : séléniate ($Se^{VI}{O_4}^{2-}$) et sélénite ($Se^{IV}{O_3}^{2-}$). Bien que les mécanismes de la toxicité des séléniates et de sélénites ne soient pas totalement élucidés, il y a de bonnes raisons de penser que le caractère toxique de ces composés est lié à leur pouvoir oxydant. La réactivité élevée du sélénite avec les groupements thiol peut expliquer son caractère toxique. Le sélénite réagit notamment avec le glutathion pour former du sélénodiglutathion, produisant les composés fortement toxiques, H_2O_2 et ${O_2}^{2-}$.

Les bactéries ont développé divers stratégies leur permettant de contrebalancer la toxicité des métaux lourds et métalloïdes [Nie99, LNBL03, SHS$^+$05, Sil98]. Plusieurs opérons de résistance à des métaux sont situés sur des transposons et des plasmides. Cependant, récemment certains gènes chromosomiques de résistance aux métaux ont

été également identifiés dans plusieurs espèces bactériennes. Il a également été rapporté que diverses espèces de bactéries éliminent le caractère toxique du sélénite en le réduisant en sélénium élémentaire (insoluble et non-toxique) [SO99]. C'est dans ce contexte que nous nous sommes intéressés à une souche d'une bactérie gram négative : *Herminiimonas arsenicoxydans* (ULPAs1). Une bactérie mutante de la souche UlPAs1 dans laquelle le transposon mini-Tn5 *lacZ2* [LHJT90] où les Tn-éléments sont insérés dans les gènes induits par le sélénium. En effet, chez ce mutant on assiste à une induction de l'expression du gène *lacZ* (et donc production de l'enzyme β-galactosidase) en présence de sélénite. Plusieurs travaux ont exploité le couplage entre la reconnaissance biologique utilisant des gènes 'reporter' pour le développement de biocapteurs à cellules entières [DBF$^+$00, TvdM06, FIM$^+$05].

Ainsi, dans ce chapitre, on a développé un biocapteur conductimètrique hybride pour la détection du sélénite à l'aide d'une bactérie contenant le gène *lac Z* comme 'reporter' associée à l'activité enzymatique de la glucose oxydase. En présence du sélénite, la β-galactosidase est produite puis détectée à la suite de l'addition de son substrat le lactose et son hydrolyse en glucose et galactose. La glucose produit est à son tour oxydé par la glucose oxidase provoquant des changements de conductivité au niveau de la membrane enzymatique (comme on l'a déjà vu dans le chapitre précédent). Ces changements de conductivité seront mesurés par les électrodes conductimètriques [DAE$^+$01, ADV$^+$04, MDN$^+$05], et ainsi, on arrive à corréler la valeur de la conductance à l'activité β-galactosidase produite et donc à la quantité de Se(IV) présente.

5.2 Matériels et méthodes

5.2.1 Réactifs utilisés

La glucose oxidase (GOD) (EC 1.1.3.4, 130 U/mg) est un don généreux du laboratoire de Biomolecular Electronics, IMBG, Kiev, Ukraine. L'albumine de sérum bovin (BSA), le lactose et le glucose ont été fournis par Sigma ainsi le glutaraldehyde utilisé (grade II, 25 % en solution aqueuse. Une solution mère aqueuse de Se(IV) (457 mM) a été préparée par dissolution de la quantité adéquate de sélénite de sodium (Na_2SeO_3, Aldrich) dans de l'eau ultrapure.

5.2.2 Caractéristiques de la souche bactérienne

La souche utilisée est une souche aérobie gram négative (ULPAs1), isolée d'un milieu industriel de traitement d'eaux résiduaires contaminé avec de l'arsenic [WLP$^+$99]. Cette bactérie a été isolée et étudiée dans le laboratoire de Génétique Moléculaire, Génomique, Microbiologie, de l'université Louis-Pasteur Strasbourg, France. La caractérisation phénotypique et génotypique complète de cette souche a montré que cette bactérie représente une nouvelle espèce du genre récemment décrit *'Herminiimonas'* [FRN$^+$05]. Cette souche, appelée *Herminiimonas arsenicoxydans* [MSR$^+$06], est capable de réduire le nitrate en nitrite. Elle est dépourvue d'arginine dihydrolase, de β-galactosidase et d'uréase. Elle ne produit pas d'indole à partir du tryptophane et n'hydrolyse ni l'arginine ni la gélatine. De plus, elle n'assimile pas : le glucose, le sucrose, l'arabinose, le mannose, le mannitol, le N-acétyle-glucosamine, le maltose, le gluconate, le caprate, l'adipate, le citrate, le malate, l'acétate de phényl, l'éthanol et le méthanol. Ainsi, les seules sources de carbone utilisées par la bactérie en culture étaient le lactate de sodium et la peptone. La bactérie a manifesté un métabolisme aérobie chimio-organotrophe utilisant l'oxygène en tant qu'accepteur d'électrons final. La souche a une croissance mésophile entre 4^{o}C et 30^{o}C avec une température optimale de croissance aux alentours de 25^oC et un pH optimal entre 7 et 8,5. La croissance de l'isolat de bactéries dans le CDM agar n'a pas montré d'inhibition par la tétracycline et l'ampicilline, alors que la kanamycine, le chloramphenicol, la streptomycine et le trimethoprim-sulfamethoxazol (TMP-smx) inhibent la croissance des cellules [WLP$^+$99].

La souche ULPAs1 est résistante à plusieurs des métaux et métalloïdes testés en plus de l'As(III) (MIC, 5 mM), à savoir, Se(IV) (MIC, 5 mM), Mn(II) (MIC, 5 mM), Cr(III) (MIC, 5 mM), Sb(III) (MIC, 1 mM), Ni(II) (MIC, 2 mM), Cd(II) (MIC, 1,42 mM), et Pb(II) (MIC, 1,2 mM). En revanche, la souche ULPAs1 est sensible à Hg(II), Cu(II), et à Cr(VI). Pour identifier le gène qui est impliqué dans la résistance à l'effet toxique des métaux et métalloïdes, le criblage d'une collection de mutants a été réalisé. Ainsi, une collection de plus de 5000 mutants a été produite par mutagenèse aléatoire de la souche mère *Herminiionas arsenoxydans* à l'aide du transposon mini-Tn5 [MLS$^+$03]. Parmi ces 5000 mutants testés, 34 ont montré une activité β-galactosidase en présence d'un métal ou métalloïde toxique (preuve que le transposon a bien été introduit en aval d'un promoteur régulé par un toxique). Dans

ce travail on s'est intéressé au mutant 'K5' qui a montré une induction de l'expression de l'activité β-galactosidase en présence d'ions sélénites.

5.2.3 Culture bactérienne

La souche ULPAs1 et son mutant K5 ont été cultivés dans un milieu chimiquement défini (CDM), qui a été préparé comme suit : 100 ml de la solution A (81.2 mM $MgSO_4.7H_2O$, 187 mM NH_4Cl, 70 mM Na_2SO_4, 0.574 mM K_2HPO_4, 4.57 mM $CaCl_2.2H_2O$, 446 mM lactate de sodium). 2,5 ml de solution B (4.8 mM $Fe_2SO_4.7H_2O$), et 10 ml de la solution C (950 mM $NaHCO_3$) sont mélangées puis le volume est porté à 1 litre avec de l'eau ultrapure. Le pH final du milieu est d'environ 7,2. Toutes les solutions ont été préparées avec de l'eau filtrée (avec le système de Milli-Q ; Millipore) précédemment stérilisé à l'autoclave (à 120^oC pendant 20 minutes). La solution A a été stérilisée à l'autoclave (à 120^oC pendant 20 minutes), alors que les solutions B et C ont été stérilisées par filtration (avec des filtres Millipore de 0,45 μm de diamètre de pores). Les cultures bactériennes ont été menées dans 2 ml de milieu CDM additionné de 25 μg/l kanamycine à 25^oC et agitées à 250 t/mn dans un shaker rotatoire (Grant, OLS 200) pendant 72h (voir figure 5.1). Les cultures sont ensuite centrifugées pendant 10 minutes à 5000 t/mn. La base bactérienne est conservée à 4^oC en attendant son immobilisation sur l'électrode conductimétrique.

FIG. 5.1 – Photo de l'appareil incubateur-agitateur utilisé pour la culture bactérienne

5.2.4 Immobilisation des enzymes puis des bactéries

Pour la construction de notre biocapteur, deux étapes d'immobilisation sont nécessaires :

1- Immobilisation des enzymes : Un mélange contenant 5% GOD (w/w), 5 % BSA et 10% glycérol dans du tampon phosphate 20 mM pH 7,4 a été préparé. 0,2 μL de cette solution enzymatique est ensuite déposé sur les parties sensibles des électrodes de travail et de référence. Le capteur est ensuite placé dans une atmosphère saturée en glutaraldéhyde pendant 30 minutes afin de permettre la co-réticulation de l'enzyme avec la BSA. Après immobilisation, le biocapteur est séché 30 minutes à l'air (voir figure 5.2).

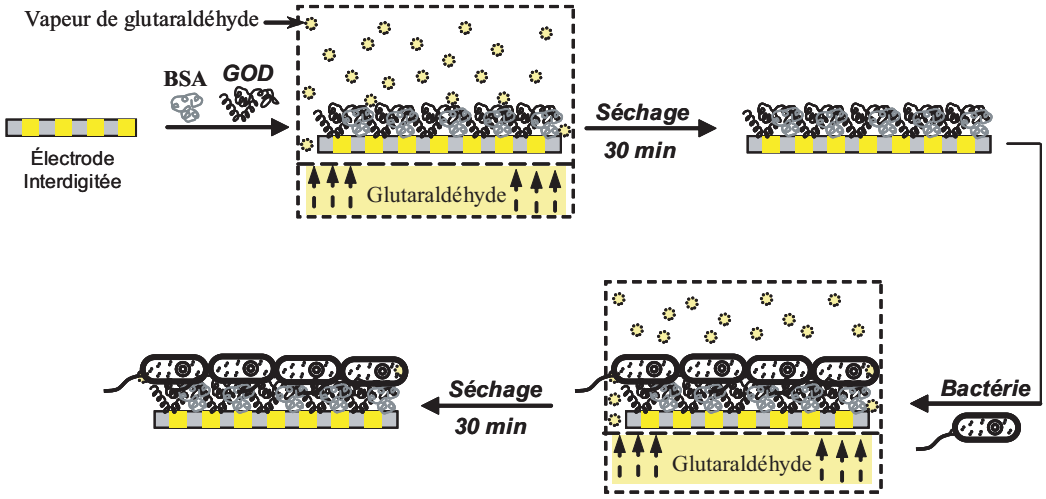


FIG. 5.2 – Représentation schématique des différentes étapes de la procédure d'immobilisation de la GOD et de la bactérie

2- Immobilisation des bactéries : 0,5 μL du culot de la culture bactérienne de la souche K5 et de la souche ULPAs1 (membrane inactive) ont été déposés, respectivement, sur la surface de l'électrode de travail et de l'électrode de référence ; le biocapteur est ensuite incubé pendant 30 minutes dans une vapeur saturée en glutaraldéhyde et finalement séché à l'air pendant 30 minutes. La photo prise au microscope électronique à balayage (MEB) de la membrane hybride (fig. 5.3) montre un dépôt de bactéries couvrant la surface entière de l'électrode.

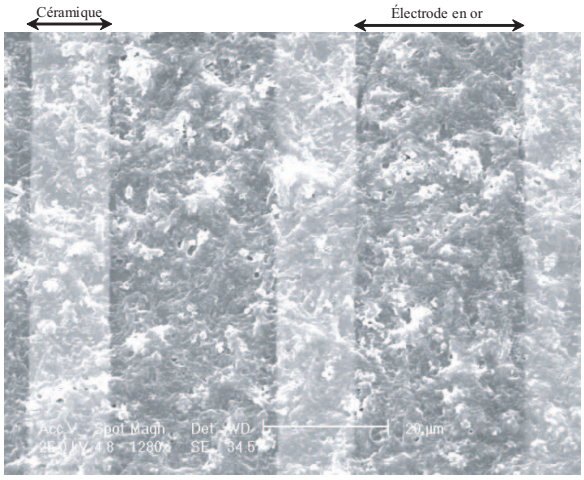


FIG. 5.3 – Image de l'électrode de travail observée au MEB

5.2.5 Exposition des bactéries au sélenium

Deux procédures différentes d'exposition des bactéries au sélénium ont été testées :

1. "Post-exposition" : Le biocapteur préparé en utilisant la culot de la culture bactérienne comme décrit précédemment est incubé dans le milieu CDM, additionné d'une certaine concentration de sélénium, pendant un temps défini.
2. "Pré-exposition" : Dans ce cas, la culture de bactéries est exposée au sélénium avant immobilisation. Les mêmes étapes sont effectuées pour la culture de bactéries, par contre, après centrifugation, une quantité bien déterminée de sélénium est ajoutée au milieu CDM puis ce denier est rajouté au culot bactérien. Après 90 heures d'incubation, la culture de bactéries a été centrifugée pendant 10 minutes à 5000 t/mn puis, comme décrit précédemment, le culot bactérien est utilisé pour la réalisation du biocapteur.

Finalement, avant son utilisation, chaque biocapteur est transféré dans du tampon phosphate de 5 mM, pH 7,4 pendant 15 minutes.

5.3 Résultats et discussion

5.3.1 Tests préliminaires et études des caractéristiques analytiques du biocapteur

Les premières expériences ont été réalisées avec un biocapteur préparé en utilisant le culot de culture bactérienne comme décrit dans la section 5.2.4 et la post-incubation avec 0,5 mM de sélénium a été appliquée pendant 90 heures. Des exemples d'allures de courbes typiques représentant les réponses du biocapteur suite à l'ajout de lactose dans la cellule de mesure sont présentés sur la figure 5.4. La ligne de base de réponse a été enregistrée dans le tampon avant l'injection du substrat. La réponse à l'équilibre du biocapteur a été obtenue environ 4 à 6 minutes après l'ajout du lactose.

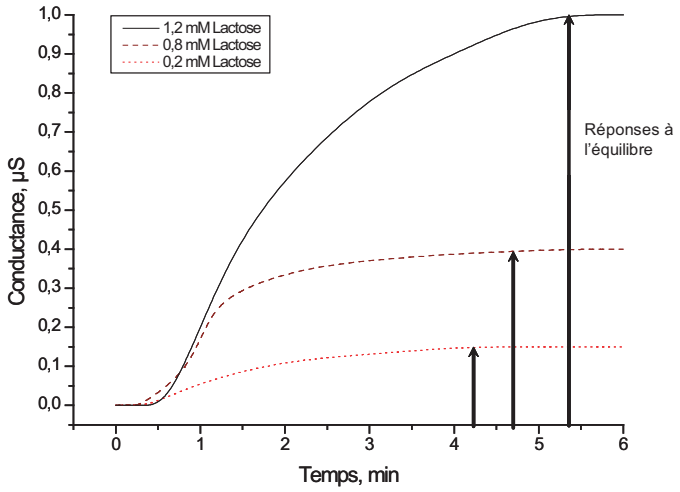


FIG. 5.4 – Réponse typique du biocapteur en fonction du temps après ajout du lactose

Ensuite, la réponse du biocapteur (exposé préalablement pendant 90 h à 0,5 mM sélénite) a été mesurée pour différentes concentrations de lactose. Comme on peut le voir sur la figure 5.5, la conductance à l'équilibre est directement proportionnelle à la quantité de substrat dans une gamme de concentration du lactose comprise entre 0,2 et 2 mM.

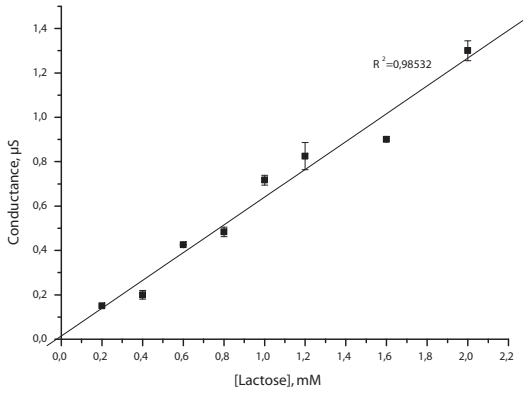


FIG. 5.5 – Courbe de calibration du lactose avec le biocapteur incubé pendant 90 heures en présence de 0,5 mM de sélénite

Afin de confirmer que les réponses obtenues précédemment reflètent bien une induction de l'activité β-galactosidase par le sélénium, on a comparé les réponses des biocapteurs incubés 72 heures, respectivement, sans Se, en présence de 0,3 mM de Se et en présence de 0,5 mM de Se pour 1 mM lactose (figure 5.6).

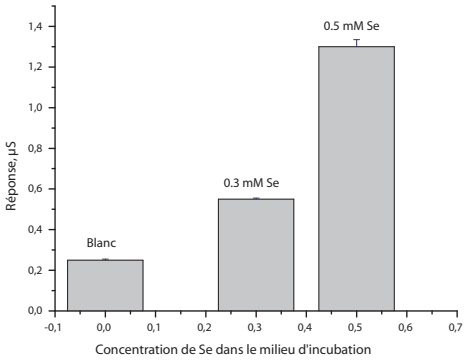


FIG. 5.6 – Comparison des réponses du biocapteur témoin avec le biocapteur incubé en présence de différentes concentrations de Se

Ainsi, on a pu constater que la conductance augmente avec la concentration de Se, ce qui montre bien la faisabilité de notre biocapteur à base de GOD et de bactéries pour la détection du sélénite.

5.3.2 Effets de la concentration en lactose utilisée sur la sensibilité du biocapteur

Pour déterminer la concentration (ou l'intervalle de concentration) de lactose idéal(e) pour la détection du Se, on a étudié le changement de la sensibilité du biocapteur avec la variation de concentration en lactose injectée et ceci en comparant les différentes valeurs de conductance obtenues pour chaque concentration de lactose pour des bactéries exposées à 0,3 et 0,5 mM Se (voir fig. 5.7).

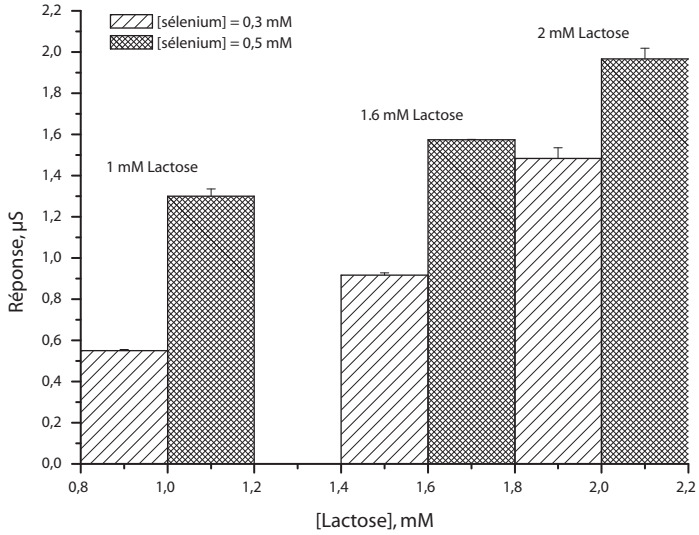


FIG. 5.7 – Détermination de la concentration de lactose à ajouter pour une sensibilité optimale du biocapteur

Les résultats montrent que la sensibilité augmente avec la diminution de la concentration de lactose. En effet, pour 1mM de lactose injectée, la valeur de conductance augmente de 136% environ en passant de 0,3 à 0,5 mM Se alors que pour 1,6 et 2 mM elle n'augmente que de 77% et 33%, respectivement. Suite à ces observations, des concentrations de 1 et 1,6 mM de lactose ont été employées pour toutes les expériences qui ont suivi.

5.3.3 Comparaison des réponses du biocapteur obtenues selon le mode d'exposition au sélénium adopté

La comparaison des réponses des biocapteurs obtenues après pré-exposition ou post-exposition en présence de 0,5 mM Se est présentée sur la figure 5.8. Comme on peut le voir, une conductance plus élevée est obtenue dans le cas du biocapteur préparé avec des bactéries pré-exposées au sélénite avant leur immobilisation sur la surface de l'électrode.

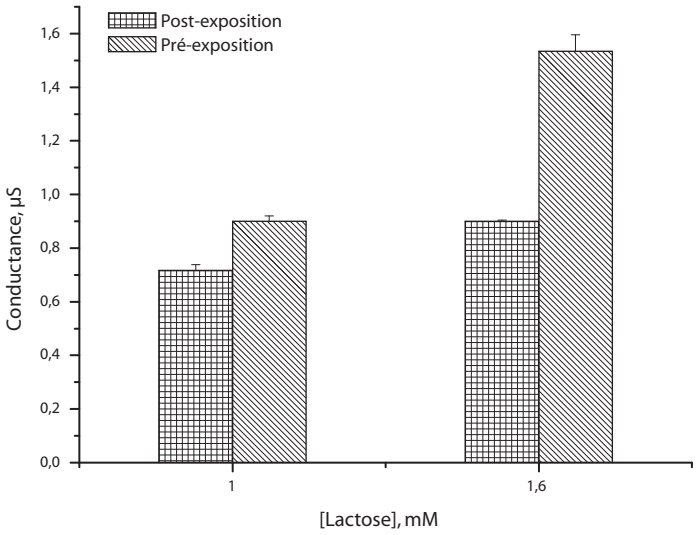


FIG. 5.8 – Comparaison des réponses du biocapteurs selon le mode d'exposition au sélénite

La perte de signal en appliquant la post-exposition est encore plus visible pour une concentration de lactose de 1,6 mM puisqu'on assiste à une perte de signal de l'ordre de 40% alors que pour 1 mM lactose, elle est de 22% seulement. Ceci peut être expliqué par le fait que quand le biocapteur entier est incubé avec le sélénium (post-exposition), cette étape se faisant à température ambiante pour induire l'expression de la β-galactosidase, on peut assister à une perte d'activité de la glucose oxydase qui se manifeste par une diminution visible de la réponse du biocapteur notamment quand on augmente la concentration de lactose utilisée pour le test. Cependant, étant donné que la glucose oxydase est une enzyme robuste, on peut toujours utiliser la méthode de post-exposition si on veut travailler avec des échantillons réels notamment si on

travaille avec une concentration de lactose de l'ordre de 1 mM.

5.3.4 Dosage du sélénite après optimisation

Après tous ces tests préliminaires et ces optimisations, une courbe de calibration du biocapteur conductimètrique pour la détermination du sélénite a été établie. Pour cela, la réponse du biocapteur a été testée pour des concentrations de sélénite allant de 0,1 à 0,5 mM (en réalisant des triplicats de mesure) selon la méthode de pré-exposition. Ensuite, les résultats de la quantification du sélénite, obtenues avec 1 et 1,6 mM lactose, ont été reportés sur la figure 5.9.

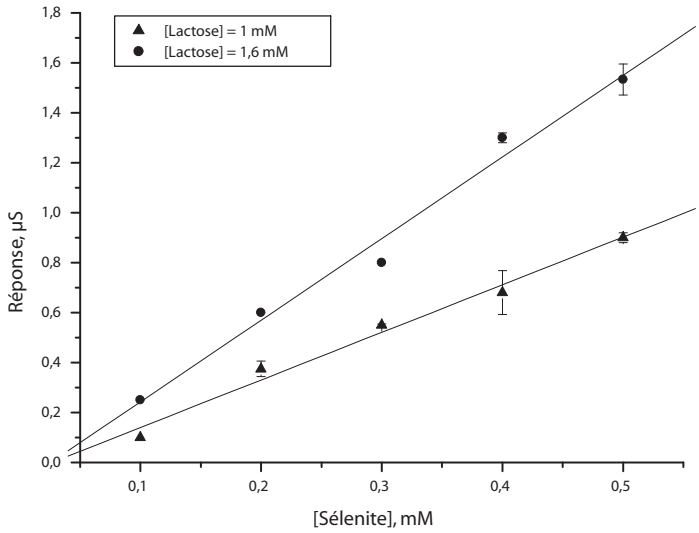


FIG. 5.9 – Courbe de calibrage par la méthode de pré-exposition pour la détermination du sélénite

Ainsi, une réponse linéaire a été obtenue pour une gamme de concentration de Se (IV) allant de 0,1 à 0,5 mM (correspondant à un intervalle de concentrations entre 7 et 39 ppm). Cette gamme de détermination du Se est deux fois plus étendue que celle (4 à 20 ppm) obtenue par le capteur chimique développé par Coo et Martinez [CM04]. On a par contre noté qu'avec la méthode de pré-exposition, on a obtenue une sensibilité meilleures avec 1,6 mM lactose qu'avec 1 mM. Ceci peut être expliqué par le fait qu'en exposant le biocapteur au Se selon la méthode de post-exposition, on a assisté

à une perte de sensibilité beaucoup plus importante pour 1,6 mM lactose que pour 1 mM (comme on l'avait vu sur la figure 5.8).

5.4 Conclusions et perspectives

Ce travail nous a permis de montrer la faisabilité d'un biocapteur conductimétrique hybride associant la glucose oxydase, en tant que biorécepteur enzymatique, à une bactérie génétiquement modifiée, qui exprime l'activité β-galactosidase en présence de sélénite, pour la détermination du sélénite. Ce système original utilisant une enzyme et une cellule entière permet la quantification du sélénite dans la gamme de concentrations entre 7 et 39 ppm.

Cette méthode est également très intéressante parce qu'elle permet d'ouvrir des voies pour utiliser différents micro-organismes génétiquement modifiés, contenant ce gène 'reporter' (gène *Lac Z*), associés à ce transducteur conductimètrique pour la détection d'autres polluants, en particulier différents métaux lourds comme le Pb et le Mn. D'autre part, la caractérisation d'autres souches de cette bactérie, du point de vue résistance à différents métaux lourds, permettraient de les utiliser pour le développement d'autres biocapteurs. Enfin, d'autres mesures avec d'autres degrés d'oxydation du sélénium et des métaux lourds permettrait de mieux appréhender la sélectivité de ce biocapteur.

Faisabilité d'un biocapteur olfactif à base de levures exprimant le récepteur humain OR17-40

Sommaire

6.1 Introduction 103
6.2 Contexte et motivations 104
6.3 Les récepteurs olfactifs et la perception de l'odeur 105
6.3.1 Présentation générale du système olfactif 105
6.3.2 Structure des récepteurs olfactifs 107
6.3.3 Activation des récepteurs couplés aux protéines G et la transmission du signal 108
6.3.4 Mécanismes moléculaires de la transduction et de la régulation du signal olfactif 109
6.3.5 Le récepteur OR17-40 110
6.4 Matériels et méthodes 111
6.4.1 Produits 111
6.4.2 Préparation des milieux de Culture 112
6.4.3 Culture des levures 112
6.4.4 Immobilisation des levures 113
6.4.5 Préparation des solutions d'odorant 114
6.5 Résultats et discussion 114
6.5.1 Optimisation de l'immobilisation 114
6.5.2 Détection de l'hélional par le biocapteur olfactif 115
6.6 Conclusions et perspectives 118

Chapitre 6

Faisabilité d'un biocapteur olfactif à base de levures exprimant le récepteur humain OR17-40

6.1 Introduction

Le système olfactif des mammifères peut identifier et distinguer un grand nombre de molécules odorantes. La détection d'odorants chimiquement distincts résulte de l'association des ligands odorants avec les récepteurs spécifiques sur les neurones sensoriels olfactifs. La découverte et la caractérisation faite par Buck *et al.* [BA91] des 18 membres différents d'une grande famille multigénique qui code pour sept protéines transmembranaires, dont l'expression est limitée à l'épithélium olfactif, et qui constitue la famille diverse de récepteurs odorants (récepteurs couplés aux protéines G) a ouvert la voie à des avancées importantes dans le domaine de l'olfaction. De plus, l'identification et le clonage de l'essentiel du répertoire de gènes fonctionnels codant pour les récepteurs odorants humains réalisé par Zozulya *et al.* [ZEN91] a été une avancée importante pour la compréhension de la spécificité ligand-récepteur et le codage combinatoire des stimulus odorants dans l'olfaction humaine.

Aujourd'hui, la quantité de brevets déposés sur les récepteurs olfactifs (ORs) rend compte de l'importance des applications industrielles attendues sur ce domaine, qui dépasse la physiologie sensorielle. Étant donné la fonction remplie par ces récepteurs,

les applications attendues sont nombreuses. Plusieurs brevets revendiquant l'utilisation des séquences dans la création de biocapteurs pour la détection d'odeurs dans les domaines de l'industrie pharmaceutique, l'aquaculture, l'alimentaire, l'industrie des parfums ont été déposés.

6.2 Contexte et motivations

Actuellement plusieurs centaines de capteurs électroniques sont commercialisés, où chaque capteur chimique est crée pour détecter un ligand. Cependant ces capteurs chimiques ne permettent pas d'identifier plusieurs odeurs à la fois. Les avancées réalisées dans la compréhension des mécanismes de la réception olfactive, et dans les techniques d'expression des différents récepteurs olfactifs dans différents systèmes hétérologues (notamment les levures [RW98]) rendent de plus en plus attractive l'idée de construire un système olfactif artificiel ("nez bioélectronique") avec des biocapteurs, qui présentent des réactions croisées et différentes sensibilités pour les odorants. Ainsi, plusieurs travaux décrivant des méthodes de détection d'odorants utilisant différents types de biorécepteurs ont été publiés. Certains utilisent l'immobilisation du récepteur olfactif protéique en lui-même [Wu99] ; d'autres mettent en œuvre des fractions membranaires de microorganismes exprimant le récepteur olfactif tels que *Saccharomyces cerevisiae* [HJRM$^+$07, GCE$^+$06] ou *Escherichia coli* [SKP06]. Un autre type de biocapteur olfactif utilisant l'antenne d'un insecte comme élément sensible a été décrit par Schutz *et al.* [SSS$^+$00]. La plupart de ces méthodes utilisent le système de transduction piézoélectrique. Malgré les échanges ioniques qui ont lieu suite à la fixation de l'odorant sur le récepteur olfactif, aucune méthode utilisant un transducteur conductimètrique pour la détection d'odorants n'a été encore développée.

Ce travail a été entrepris suite aux différents tests réalisés avec des préparations membranaires du récepteur olfactif du rat I7 par Hou *et al.* [HJRM$^+$07]. En effet, dans le cadre du projet "Action concertée : biocapteur olfactif" et du projet "Européen Single protein nanobiosensor gird array" (SPOT-NOSED) visant à élaborer des micro et nanobiocapteurs olfactifs pour le développement de nez électroniques, Yanxia Hou avait travaillé sur plusieurs techniques d'immobilisation de récepteurs olfactifs sur des électrodes d'or pour la détection d'odorants [Hou05]. Elle a pu ainsi détecter des molécules d'odorant par les récepteurs olfactifs du rat (OR I7)immobilisés

dans leur fraction membranaires, à l'aide de mesures de spectroscopie d'impédance électrochimique.

Après la réussite de Minic *et al.* dans l'expression du récepteur olfactif humain OR 17-40 chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* [MPG+05], nous avons pensé à immobiliser ces cellules entières sur des électrodes interdigitées pour la détection de l'hélional.

6.3 Les récepteurs olfactifs et la perception de l'odeur

6.3.1 Présentation générale du système olfactif

Un millier de gènes, soit environ 1% du génome, est destiné à exprimer des récepteurs olfactifs. Le système olfactif est donc équipé d'un grand nombre de récepteurs qui constitue d'ailleurs la plus grande famille de gènes connue à l'heure actuelle.

La muqueuse olfactive est le siège de la perception des molécules odorantes. Chez les vertébrés supérieurs, elle est localisée dans la région dorsale postérieure de la cavité nasale. Sa surface se restreint à quelques cm^2 mais, du fait de sa position et de l'architecture de la cavité nasale, qui canalise l'air vers cette zone, l'accès des molécules odorantes sur la muqueuse olfactive est optimal. Depuis la face apicale, la muqueuse olfactive comporte un mucus et deux couches de tissus, l'épithélium olfactif et la sous-muqueuse, séparés par une lame basale (*lamina propria*).

L'épithélium olfactif est constitué de trois types cellulaires : les cellules de soutien, les cellules basales et les cellules neuroréceptrices : les neurones olfactifs (Figure 6.1 [1]).

Les cellules de soutien s'étendent de la lame basale jusqu'à la lumière nasale où elles se terminent en formant des microvillosités. Elles se juxtaposent entre les neurones olfactifs, permettant ainsi de les isoler les uns des autres. Les cellules de soutien participent aussi à la régulation des concentrations ioniques, notamment à la régulation potassique qui est perturbée lors d'une dépolarisation des neurones olfactifs. De façon générale, elles contribuent à la régulation de l'environnement des neurones olfactifs. Les neurones récepteurs olfactifs, sont formés d'un axone qui se projette vers la région bulbaire et d'une dendrite qui se termine dans le mucus par une protubérance d'où

[1] http ://www.123bio.net/revues/vmatarazzo/fig2.html

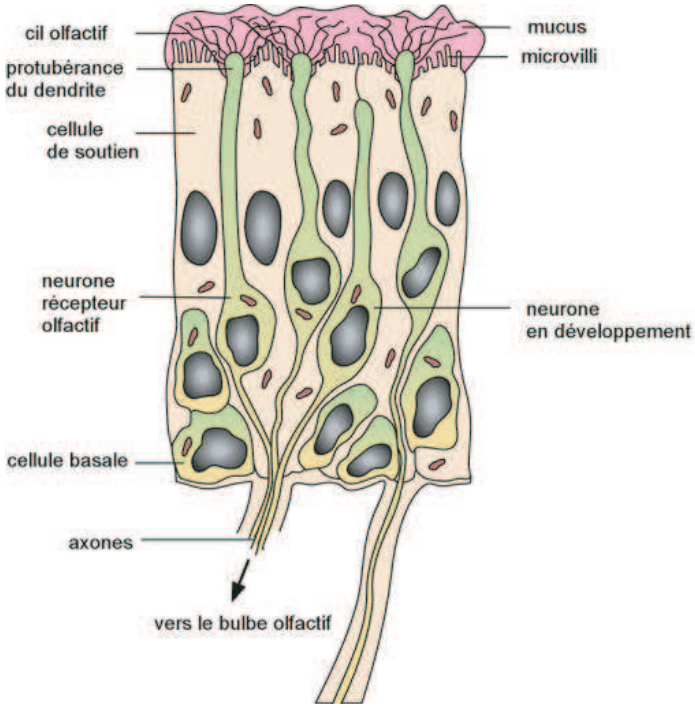


FIG. 6.1 – Représentation schématique d'une coupe d'épithélium olfactif de vertébré

émergent plusieurs cils. C'est au niveau de ces cils que s'effectue la transformation du signal chimique (la molécule odorante) en signal électrique. La membrane des cils olfactifs contient l'ensemble des éléments protéiques nécessaires pour déclencher le potentiel de récepteur, ce dernier étant à l'origine du potentiel d'action si son amplitude est suffisante.

Comme nous l'avons indiqué précédemment, la muqueuse olfactive des vertébrés est recouverte d'un mucus. Parmi les protéines sécrétées dans ce mucus, il a été observé des protéines capables de lier les molécules odorantes : les OBPs. Ces protéines solubles appartiennent à la famille des lipocalines. Cette famille comprend des protéines capables de transporter des molécules lipophiles comme le cholestérol, les stéroïdes et le rétinol.

La présence de molécules odorantes au niveau de l'épithélium olfactif conduit à la génèse d'un message électrique transmis par le nerf olfactif à un relais, le bulbe olfactif puis à diverses structures centrales.

6.3.2 Structure des récepteurs olfactifs

Les récepteurs olfactifs appartiennent à la super-famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs). Les RCPGs sont des protéines monomériques et intramembranaires de quelques centaines d'acides aminés (300 à 1200 résidus environ) dont la caractéristique majeure est leur organisation en sept régions hydrophobes en hélice α comme le montre la figure 6.2.

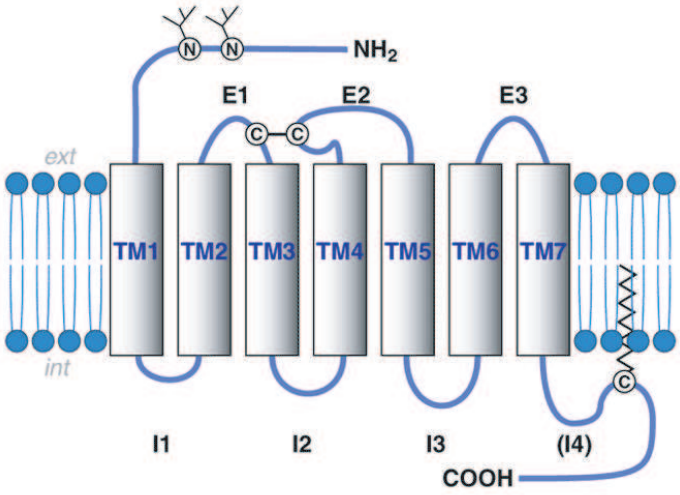


FIG. 6.2 – Schéma représentatif de la structure des récepteurs couplés aux protéines-G

Des études ont montré le caractère transmembranaire des domaines hydrophobes et ont permis d'assigner une orientation à la protéine : l'extrémité amino-terminale est extracellulaire alors que l'extrémité carboxy-terminale est intracellulaire. La longueur des extrémités amino- et carboxyterminales, de même que celle de certaines boucles extra- ou intracellulaires, varie selon le récepteur [2].

Les nombreux RCPGs clonés peuvent être répartis en trois grands groupes, en fonction des homologies de séquence primaire qu'ils présentent entre eux :

Le groupe I est constitué des récepteurs apparentés à la rhodopsine, c'est-à-dire la grande majorité des RCPGs que sont les récepteurs des composés aminés, puriques

[2]D'après Jean-Marie BOTTO, une classification des Récepteurs Couplés aux Protéines-G, http ://www.123bio.net

et lipidiques, de certains peptides, des glycoprotéines, des protéases, ainsi que les récepteurs sensoriels qui répondent aux stimuli gustatifs, olfactifs et visuels.

Le groupe II rassemble les récepteurs de certaines hormones peptidiques (calcitonine, CRF, GIP, glucagon et glucagon-like peptide, GH-RH, PTH et PTH-RP, PACAP, sécrétine et VIP), ainsi que de l'hormone diurétique.

Enfin, le groupe III, le moins représenté, est composé des huit sous-types de récepteurs métabotropiques de l'acide glutamique associés au récepteur des glandes parathyroïdes, sensible aux ions Ca^{++} (Ca^{++}-sensing) et du récepteur de l'acide γ-aminobutyrique (GAB).

6.3.3 Activation des récepteurs couplés aux protéines G et la transmission du signal

Les protéines-G jouent un rôle central dans la signalisation intracellulaire. Elles amplifient les réponses des récepteurs et influencent l'amplitude et les délais des signaux eux-mêmes. Elles orientent également les signaux en couplant les récepteurs à leurs effecteurs appropriés. Les protéines-G existent sous deux états conformationnels, l'une active qui est liée au GTP et l'autre inactive liée au GDP. Dans les cellules non stimulées, le GTP est hydrolysé par l'activité GTPase et par conséquent la forme liée au GDP, inactive, prédomine. Les récepteurs mis en jeu par les ligands augmentent la vitesse de l'échange GDP-GTP et, de ce fait, la quantité de protéine G activée, liée au GTP. Les protéines-G qui nous intéressent ici sont des hétérotrimères composés d'une sous-unité α, liant le GDP ou le GTP et d'un complexe $\beta\gamma$ indissociable en milieu physiologique. La sous-unité α donne son identité à la protéine G. En liant le GTP, cette sous-unité se dissocie du complexe $\beta\gamma$ et stimule sélectivement les protéines effectrices (voir figure 6.3)[3].

[3]http ://www.123bio.net/revues/nzsurger/

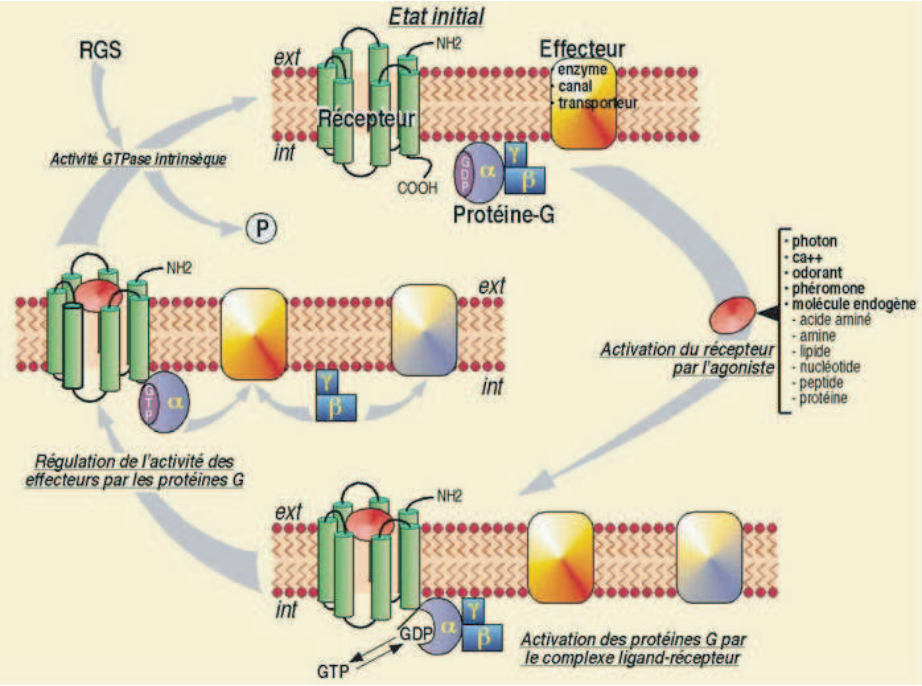


FIG. 6.3 – Cycle d'activation des récepteurs couplés aux protéines-G

6.3.4 Mécanismes moléculaires de la transduction et de la régulation du signal olfactif

Comme on l'a vu dans le paragraphe 6.3.1, avec le concours des OBPs, les molécules d'odorants se fixent plus facilement sur le mucus de la muqueuse olfactive pour entrer en contact avec les récepteurs olfactifs. Chez les mammifères, une fois que les récepteurs olfactifs fixent la molécule odorante, une cascade d'événements (figure 6.4) qui transforme l'énergie de liaison chimique en un signal neuronal (c'est-à-dire, un changement du potentiel de membrane des neurones sensoriels olfactifs (OSNs)).

Cette cascade commence par l'activation de la protéine G par le complexe ligand-récepteur comme on l'a expliqué dans le paragraphe précédent. Cette dernière va à son tour activer l'adénylate cyclase qui catalyse la production du second messager intracellulaire l'AMP cyclique (AMP_c) à partir de l'ATP intracellulaire. C'est ce messager intracellulaire qui contrôle l'ouverture des canaux ioniques notamment le

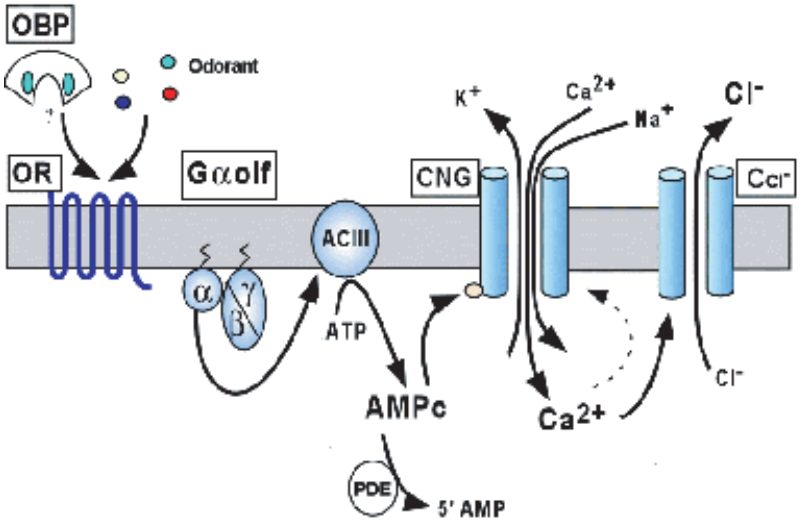


FIG. 6.4 – Les mécanismes de transduction du signal olfactif

canal ionique perméable aux cations (Ca^{2+}, Na^{+}). Ce flux d'ions Ca^{2+} et Na^{+} rend le potentiel à l'intérieur de la cellule moins négatif. A l'augmentation du calcium intracellulaire suit une activation des canaux chlorure qui sont calcium-dépendants. L'ouverture du canal chlorure augmente la dépolarisation du neurone. La transduction est opérée quand le courant récepteur devient générateur en induisant la naissance d'un ou plusieurs potentiels d'action dans le segment initial de l'axone [Hol97]. Le potentiel d'action est alors transmis au bulbe olfactif par l'intermédiaire des axones à travers tout le circuit neuronal menant finalement à l'identification de "l'odeur".

6.3.5 Le récepteur OR17-40

Les progrès importants réalisés ces dernières années dans l'expression fonctionnelle des récepteurs olfactifs à la surface de la membrane plasmique de différentes cellules hétérologues [RW98, WOW+99, MPG+05, LPG+03, MSSPA05] ont permis une meilleure connaissance des mécanismes de l'olfaction. Le système olfactif des vertébrés a une énorme puissance discriminatoire des odorants. Les humains, par exemple, sont connus pour être capables de faire la distinction entre des milliers de molécules différentes d'odeur. Même des changements subtils dans la structure moléculaire d'un

odorant peut mener à provoquer des changements dans l'odeur perçue [WOW+99]. En effet, dans le cas du récepteur olfactif humain OR 17-40, une analyse d'une centaine d'odorants différents a permis d'identifier un seul composant comme étant le seul agoniste efficace de ce récepteur : l'hélional (figure 6.5).

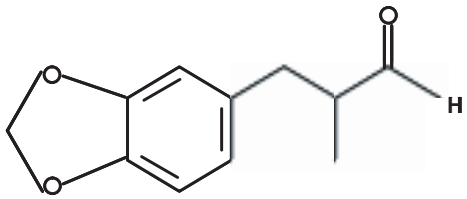


FIG. 6.5 – Structure chimique de l'hélional

Une autre équipe (Jacquier *et al.*) s'est aussi intéressée à l'analyse des propriétés structurales des molécules odorantes activant le récepteur OR 17-40 en examinant une collection d'une centaine de dérivés chimiques apparentés à l'hélional. Ils ont pu ainsi montrer que la présence d'un groupement aldéhyde relié à un anneau aromatique par l'intermédiaire d'une chaîne de 3 à 5 carbones semble essentielle pour la liaison au récepteur OR 17-40 ; alors qu'un groupement méthylique en position α ou β semble être nécessaire pour son activation [Jac05].

Ainsi, dans ce chapitre on se propose de fixer la levure *Saccharomyces cerevisiae* avec le récepteur humain OR 17-40 exprimé à sa membrane (comme décrit dans [MPG+05]) sur les transducteurs conductimètriques en vue d'étudier la faisabilité d'un biocapteur olfactif à cellules entières.

6.4 Matériels et méthodes

6.4.1 Produits

Les produits utilisés pour la préparation du milieu de culture ont été approvisionnés chez différents fournisseurs :

- Adenine, glucose et galactose chez Sigma ;
- Yeast nitrogen base (YNB) chez Difco ;

- Adenine, Synthetic drop-out CSM media without HIS, LEU, TRP, URA (CSM-X) chez QBiogen ;
- Acide lactique chez Fisher.

L'hélional est un don généreux de Givaudan-Roure (Dubendorf, Switzerland) ; l'heptanal (pureté 95%) a été commandé chez Aldrich. Le diméthylsulfoxide (DMSO) (pureté $\geq$ 99%), la polylysine et la concanavaline A ont été approvisionné chez Sigma.

6.4.2 Préparation des milieux de Culture

- Milieu A : 6,7 g YNB + 0,74 g CSM-X avec 950 mL eau ultrapure. On aliquote le volume dans des petits flacons de 100 ou 200 mL puis on les autoclave ;
- Milieu glucose : Milieu A + 40 mg/L adenine (à partir d'une solution mère 20%) + 2% glucose (solution mère 20%) ;
- Milieu lactate : Milieu A + 40 mg/L adenine + 3% lactate (solution mère 30%) ;
- Milieu galactose : Milieu A + 40 mg/L adenine + 2% galactose (solution mère 20%).

Les solutions mères de glucose (20%), lactate (30%), galactose (20%) et adenine (20%) sont préparées puis autoclavées.

6.4.3 Culture des levures

Le récepteur olfactif humain OR17-40 a été fonctionnellement exprimé dans la souche MC18 de la levure *S. cerevisiae* comme décrit dans le travail de Minic *et al.* [MPG+05]. D'autres levures exprimant le récepteur à la somatostatine (SSTR2) ont aussi été cultivés pour être immobilisées sur l'électrode de référence (dans les mesures différentielles). La culture des levures se fait selon les étapes suivantes :

- Culture 1 : on fait pousser les levures dans 2 mL de milieu glucose pendant 24 heures à 30°C sous agitation à 200 rpm.
- Centrifugation et lavage : les cultures sont centrifugées pendant 5 minutes à 4000 rpm puis lavées à l'eau ultrapure stérile deux fois afin d'éliminer toute trace du milieu glucose.
- Culture 2 : Les cellules sont ensuite incubées à 30°C pendant 4 à 6 heures dans 2 mL de milieu lactate pour bien éliminer le glucose.
- Centrifugation : on recentrifuge les cellules à 4000 rpm pendant 5 minutes.

– Induction de l'expression des récepteur olfactifs : incubation dans 5 mL de milieu galactose à 15°C pendant 60 h pour avoir une densité optique (DO) à 600 nm comprise entre 1 et 3.

A la fin de l'induction, les levures sont conservées à -4°C.

6.4.4 Immobilisation des levures

Après centrifugation de la culture, on élimine le surnageant contenant le milieu de culture et on récupère le culot cellulaire. On dépose 0,7 μL de la solution 0,1 % de polylysine (figure 6.6), préalablement préparée, sur les deux électrodes (de référence et de travail) ; séchage à l'air pendant 15 minutes. Les électrodes sont ensuite lavées délicatement 3 fois avec l'eau ultrapure. Aprés leur séchage à l'air, 0,7 μL de levures sont déposées sur chaque électrode (*S. cerevisiae* exprimant le récepteur SSTR2 sur l'électrode de référence et *S. cerevisiae* exprimant le récepteur olfactif OR 17-40 sur l'électrode de travail). Enfin, on laisse sécher 20 min à l'air.

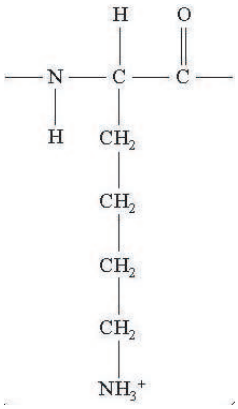


FIG. 6.6 – Structure chimique de la polylysine

Le dépôt d'une "double couche" de polylysine a aussi été testé. On suit les mêmes étapes que précédemment avec à la fin ajout de 0,7 μL de polylysine sur la couche de levures. Une deuxième méthode d'immobilisation faisait intervenir la concanavaline A (1 mg/mL) au lieu de la polylysine suivant les mêmes étapes que pour la première méthode d'immobilisation.

6.4.5 Préparation des solutions d'odorant

Les solutions d'hélional sont préparées fraîchement chaque jour de mesures. La solution mère d'hélional (10^{-1} M) est préparée en ajoutant 10 μL de la solution d'hélional pur à 510 μL de DMSO (diméthyl sulfoxide). À partir de cette solution, une dillution (10^{-3} M) est directement préparée en diluant 10 μL de la solution mère (10^{-1} M) dans 990 μL d'eau ultrapure. Les dilutions suivantes sont préparées par des dilutions successives 1 :10 dans l'eau ultrapure.

6.5 Résultats et discussion

6.5.1 Optimisation de l'immobilisation

Comme décrit précédemment, nous avons essayé deux protocoles d'immobilisation avec la polylysine : mono- et double-couche. Les résultats obtenus pour une concentration d'hélional de 10^{-13} M sont représentés sur la figure 6.7.

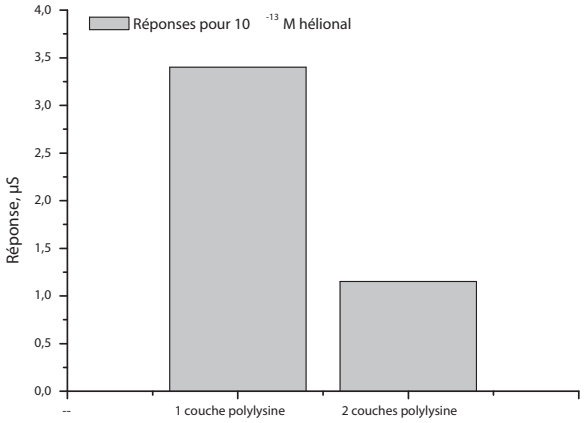


FIG. 6.7 – Optimisation de l'immobilisation avec la polylysine

On observe une réponse de l'ordre de 34% de la réponse initiale (avec une seule couche) suite à l'ajout d'une couche de polylysine supplémentaire. Ceci peut être expliqué par une moins bonne accessibilité des récepteurs olfactifs membranaires pour la fixation de l'odorant.

L'immobilisation avec la concanavaline A n'ayant pas donné des résultats satisfaisants, nous avons donc retenu la pré-fonctionnalisation de l'électrode avec la polylysine, comme méthode d'immobilisation, pour toute la suite des mesures.

6.5.2 Détection de l'hélional par le biocapteur olfactif

6.5.2.1 Réponse en fonction du temps

La cinétique de la réponse du biocapteur avec les levures exprimant le récepteur OR17-40 est présentée sur la figure 6.8. L'allure de la courbe montre une augmentation rapide du signal suivie d'une chute légèrement plus lente. Cette allure de courbe est similaire à celle observée par Ko *et al.* avec un biocapteur fonctionnalisé avec des cellules embryonnaires humaines (HEK-293) exprimant le récepteur olfactif du rat I7 [KP05]. Ainsi, la formation-dissociation du complexe ligand-récepteur fait varier significativement la conductance à la surface de l'électrode. Le temps de réponse, très court, est de l'ordre de 20 secondes.

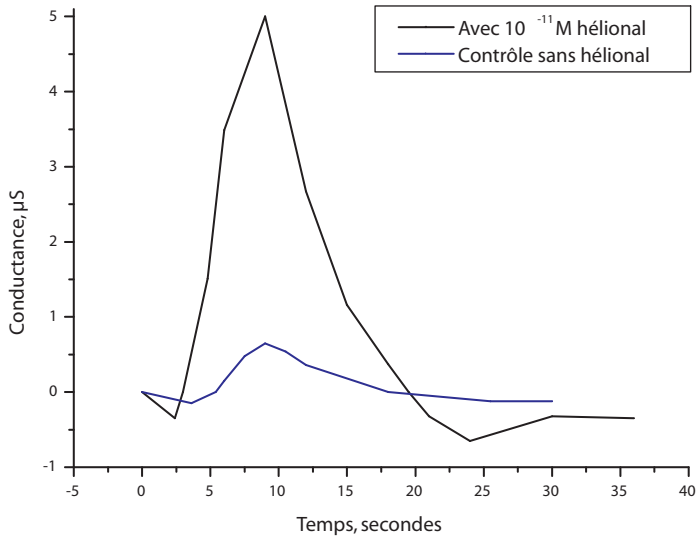


FIG. 6.8 – Cinétique de la réponse du biocapteur avec les levures exprimant le récepteur OR 17-40

On remarque également, qu'on obtient une légère réponse lors de l'expérience de

contrôle (où l'hélional est remplacé par l'eau ultrapure diluée dans le DMSO à un taux de dilution égal à celui de l'odorant). Ceci peut être expliqué par le fait que la membrane cellulaire peut adsorber une partie du solvant (adsorption non spécifique).

6.5.2.2 Réponse en fonction de la dose d'odorant

Les réponses du capteur conductimétrique avec la levure exprimant le récepteur OR17-40 à différentes concentrations d'hélional allant de 10^{-13} à 10^{-8} M sont présentées sur la figure 6.9.

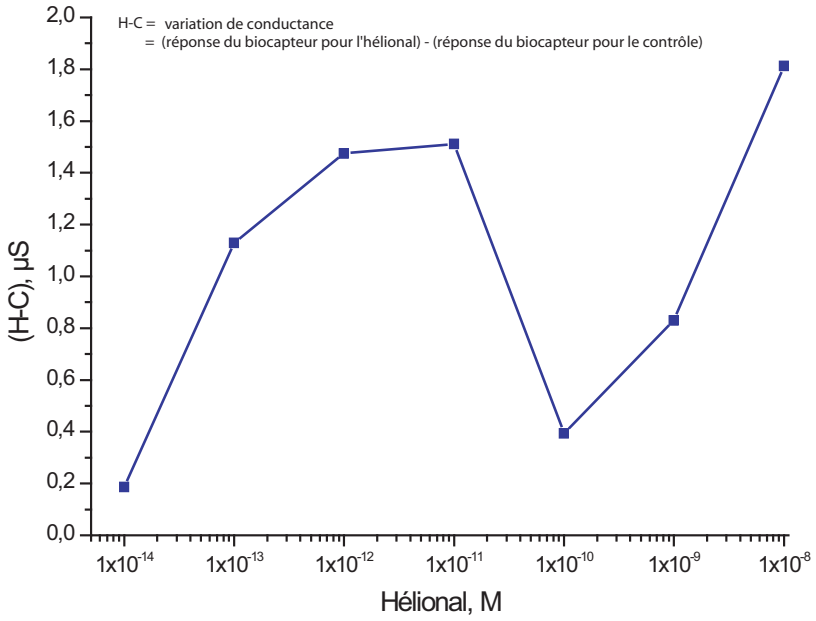


FIG. 6.9 – Réponse en fonction de la concentration d'odorant

On observe une réponse, en fonction de la concentration, en forme de cloche avec un maximum de réponse autour de 10^{-11} M d'hélional. Au-delà de cette concentration on a une diminution de la réponse jusqu'à 10^{-10} M puis un second pic de réponse vers 10^{-8} M. Ces réponses diffèrent des courbes "classiques" de dosage qui généralement se terminent par un palier de saturation [MDB+06]. Cependant ce phénomène a déjà été observé par Krautwurst *et al.* qui, en exprimant un récepteur chimérique dans les cellules HEK293, ont observé des réponses moins importantes pour des concentrations d'odorant (octanal) de 1 et de 30 μM que celle obtenue pour 10 μM [KYR98]. Gomila

et al. ont, quant à eux, observé une chute d'expression vers 10^{-7} M pour le récepteur I7 du rat [GCE^{+}06]. De même, Levasseur *et al.* ont trouvé des résultats comparables aux nôtres quand ils ont quantifié la réponse du récepteur olfactif humain OR17-40 chez les cellules ODORA suite à l'exposition à différentes doses d'hélional. En effet, ils ont observé également un maximum pour 10^{-11} M hélional [LPG^{+}03]. Ainsi, les résultats de la détection de l'hélional par le biocapteur conductimètrique à base de cellules entières montrent bien son aptitude pour le suivi du phénomène biologique de reconnaissance de l'odorant par le récepteur olfactif spécifique correspondant.

6.5.2.3 Étude de la répétitivité des réponses

Après l'étude de la réponse du biocapteur en fonction de la dose de l'odorant, on s'est intéressé à la répétitivité des mesures. Pour cela, on a effectué deux mesures suite à des additions successives de 10^{-8} M d'hélional et une mesure, après 20 minutes de repos, avec la même concentration d'odorant. Comme le montre la figure 6.10, une perte d'environ 26% du signal est observée entre deux ajouts successifs de la même concentration d'hélional. Cette perte devient de 6% après un temps de repos de 20 minutes est attendu entre les deux mesures. Ainsi, il est nécessaire de laisser un certain intervalle de temps entre deux mesures pour permettre la relaxation du récepteur après son changement de conformation suite à la fixation du ligand (odorant).

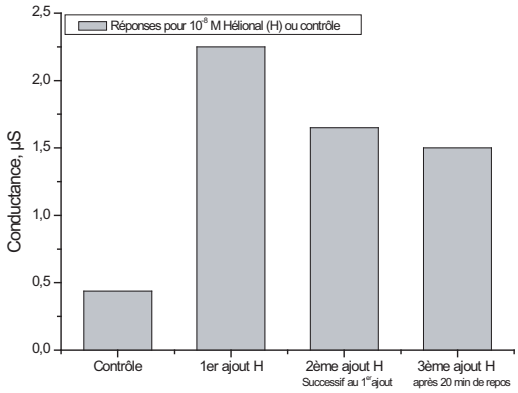


FIG. 6.10 – Étude de la répétitivité des mesures du biocapteur pour la détection de l'odorant

Enfin, on a voulu mettre à l'épreuve la sélectivité du biocapteur conductimètrique pour l'odorant spécifique du récepteur olfactif humain 17-40. Pour cela, on a comparé les réponses du biocapteur à l'hélional avec celles obtenues suite à l'addition d'un odorant non spécifique : l'heptanal. Comme le montre la figure 6.11, on a une variation de signal très faible pour l'heptanal alors que la réponse est bien nette pour l'odorant spécifique (l'hélional) ce qui montre bien que le biocapteur développé permet de suivre uniquement les phénomènes électriques dus à la fixation du ligand spécifique du récepteur olfactif humain OR17-40 exprimé au niveau de la membrane cellulaire de la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

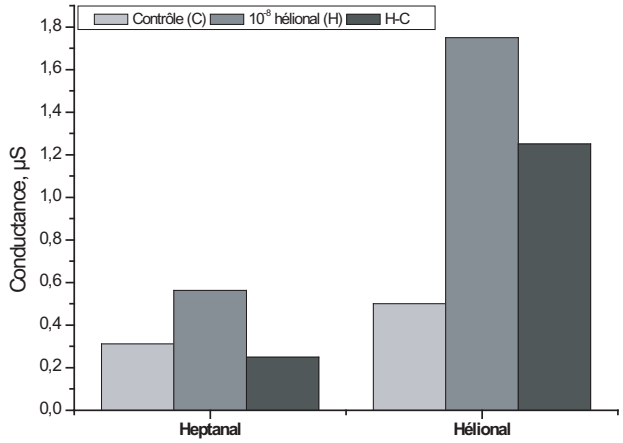


FIG. 6.11 – Sélectivité du biocapteur pour l'odorant spécifique du récepteur olfactif humain OR17-40

6.6 Conclusions et perspectives

Ce chapitre a permis de montrer la faisabilité d'un biocapteur olfactif pour la détection de l'hélional, à l'aide de levures *S. Cerevisiae* exprimant le récepteur olfactif humain OR17-40 fixées sur un microtransducteur conductimétrique.

Le biocapteur ainsi développé a montré une réponse quasi-instantanée (une dizaine de secondes pour atteindre le maximum) à l'hélional. La réponse en fonction de la

concentration de l'odorant a montré une courbe en forme de cloche avec un premier maximum de réponse autour de 10^{-11} M d'hélional puis un deuxième pic vers 10^{-8} M. Ce phénomène ayant déjà été observé avec des tests directs (dosages calciques par exemple) sur des cellules exprimant différents récepteurs olfactifs [KYR98, GCE$^+$06, LPG$^+$03], on a pu conclure que le biocapteur conductimètrique permet bien de mimer le phénomène biologique de fixation de l'odorant par le récepteur olfactif spécifique. De plus, le biocapteur obtenu est bien sélectif de l'odorant ligand (hélional) du récepteur olfactif humain 17-40 puisqu'il a donné un signal très faible suite à l'ajout d'un odorant non spécifique : l'heptanal.

Ces résultats préliminaires ouvrent la voix à plusieurs perspectives. En effet, il serait intéressant d'élargir la gamme de dosage pour des concentrations plus élevées d'hélional. D'autres caractéristiques analytiques du biocapteur sont aussi à déterminer tels que la stabilité au cours du temps. Enfin, il faut noter que ce système pourrait être appliqué à d'autres récepteurs olfactifs spécifiques de certaines molécules odorantes d'intérêt médical tels que le formaldehyde (cancer de la prostate) [SSH$^+$99] ou encore l'hexanal et l'heptanal (cancer des poumons) [LDY$^+$05, DZL04].

Conclusion générale et perspectives

De nos jours, les besoins en biocapteurs visant des applications spécifiques sont réels. Et c'est pour répondre à certains de ces besoins que dans ce travail nous nous sommes intéressés au développement de différents biocapteurs utilisant des transducteurs conductimétriques se basant sur deux réseaux d'électrodes interdigitées pour des mesures en mode différentiel permettant d'éviter les interférences non spécifiques.

Dans un premier temps, avec la protéinase K comme biorécepteur, nous avons développé un biocapteur pour la détection des protéines dans les eaux naturelles (comme indicateurs de la teneur en matière organique et donc de la pollution urbaine). Un travail d'optimisation préalable a permis de déterminer le temps d'exposition à la vapeur de glutaraldéhyde (20 minutes) pour une réponse optimale. Ensuite, l'étude de l'effet de la température sur la réponse du biocapteur a montré la capacité du biocapteur à travailler à des températures basses (10°C) : paramètre important pour son utilisation sur site (fluctuations de la température de l'eau selon les saisons). De plus, le biocapteur développé à montré une stabilité élevée au cours du temps (supérieure à 1 mois) ainsi qu'une bonne reproductibilité (3,3%). L'étude de la réponse du biocapteur en fonction de la concentration de BSA (protéine de référence) a montré une gamme linéaire de dosage, entre 0,8 à 6 mg/L (en adéquation avec les gammes moyennes de concentrations observées en milieu naturel), une limite de détection d'environ 0,5 mg/L BSA et un temps de réponse rapide (valeurs à l'équilibre atteints au bout de 7 à 8 minutes). Enfin, la confrontation des réponses du biocapteur, pour différents échantillons d'eaux de rivière de la région Lyonnaise, avec les valeurs de carbone organique dissous et les teneurs en protéines déterminés par une

méthode colorimétrique classique (la microBCA protein Assay) ont montré de bonnes corrélations, preuves de la fiabilité du biocapteur conductimètrique dans le dosage des protéines dans les eaux naturelles. En perspectives de ce travail, l'immobilisation de plusieurs protéases en même temps sur les électrodes (par exemple ajout de la trypsine et de la pronase en plus de la protéinase K) pour essayer d'améliorer encore les caractéristiques analytiques du biocapteur (hydrolyse plus efficace de l'ensemble des protéines) est envisagée. De plus, la préparation de ces biocapteurs à leur utilisation sur site, en ajoutant une protection physique autour de la membrane enzymatique, avec acheminement de l'échantillon à l'aide d'un système de pompes, sera étudiée par une société spécialiste dans le développement et la commercialisation de capteurs, intéressée par notre biocapteur à protéines.

Dans la partie suivante, nous nous sommes intéressés au développement d'un biocapteur associant deux activité enzymatique : la β-galactosidase et la glucose oxydase et son application au dosage du lactose dans le lait. Le biocapteur obtenu présente une gamme linéaire de réponse se situant entre 60 et 800 μM, un temps de réponse rapide (4 minutes) ainsi qu'une durée de vie supérieure à une semaine. Ensuite, des dosage du lactose dans des échantillons de lait commerciaux à l'aide de ce biocapteur bi-enzymatique ont montré l'efficacité de ce dernier pour le suivi de la concentration de ce disaccharide.

Ces résultats montrant la réussite du suivi des effets de charge, résultant de la combinaison de l'hydrolyse enzymatique du lactose par la β-galactosidase avec l'oxydation du glucose catalysée par la glucose oxydase, à l'aide des électrodes conductimètriques ont été appliqués au dosage du sélénite (élément toxique à forte dose), en exploitant une β-gal induite dans les cellules bactériennes de *Herminiimonas arsenicoxydans* par la présence de sélénite. En effet, un biocapteur conductimétrique hybride associant la glucose oxydase, en tant que biorécepteur enzymatique, à une bactérie génétiquement modifiée, qui exprime l'activité β-galactosidase en présence de sélénite, a été développé pour la détermination du sélénite. Ce système original utilisant une enzyme et une cellule entière a permis la quantification du sélénite à des concentrations entre 7 et 39 ppm. La réussite du dosage du sélénite à l'aide de ce biocapteur ouvre des voies pour utiliser différents micro-organismes génétiquement modifiés, contenant ce gène 'reporter' (gène *Lac Z*), associés à ce transducteur conductimètrique pour la détection d'autres polluants. Les perspectives d'autres mesures avec d'autres formes oxydées du

sélénium et des métaux lourds permettraient de mieux appréhender la sélectivité de ce biocapteur.

Enfin, dans la dernière partie de ce travail, nous nous sommes intéressés au développement d'un biocapteur olfactif se basant sur l'immobilisation de levures *S. Cerevisiae* génétiquement modifiées, exprimant le récepteur olfactif humain OR17-40. La détection de l'odorant à l'aide du biocapteur ainsi développé a été montrée avec une réponse quasi-instantanée (une dizaine de secondes) à l'hélional. La réponse en fonction de la concentration de l'odorant a montré une courbe en forme de cloche avec des maximums de réponse autour de 10^{-11} et 10^{-8} M d'hélional. Par ailleurs, l'étude de la spécificité du biocapteur pour l'odorant spécifique du récepteur olfactif 17-40 a montré sa sélectivité. Ces résultats préliminaires ouvrent la voix à plusieurs perspectives notamment pour l'application de ce type de mesures conductimètriques associés à des cellules exprimant différents récepteurs olfactifs pour le suivi de différentes molécules odorantes d'intérêt médicale, pharmaceutique ou agro-alimentaire.

Annexe A

Dosage des protéines par la méthode BCA (BCA Protein Assay Kit)

Principe Le réactif est constitué d'acide bicinchoninique (BCA) et d'ions cuivriques en milieu alcalin. Les ions cuivreux générés par réduction par les protéines forment avec le BCA un complexe stable et intensément coloré (λmax = 562 nm). C'est une méthode sensible et rapide qui résiste aux détergents comme le Triton ou le SDS.

Réactifs

- Le réactif de travail BCA^{TM} : Le mélange extemporané (50 :1, Réactif A :B) est constitué de : 50 volumes de réactif A (solution de carbonate de sodium, bicarbonate de sodium, acide bicinchoninique et tartrate de sodium dans NaOH 0,1 M) + 1 volume de réactif B (sulfate de cuivre 4%).
- Étalon BSA : BSA à 2 mg/mL en 0,9% NaCl et 0,05% azide sodium.
- Pipette multicanale Biohit.
- eau ultra pure (H_2O_{up}).

Matériel

- Plaque microtitration (96 puits)
- Pipetmans P20, P100

- Pipette multicanal Biohit (1000 μL)
- Réservoir à réactif
- Lecteur de plaques ; Thermomax microplate reader (B. Braun, Science Tec)

Préparation de la gamme standard BSA en microplaques de 96 puits : 3 puits pour chaque concentration de BSA ont été préparés : blanc, 0, 25, 50, 75, 100, 150, 200 et 400 mg/L.

La microplaque sera rempli comme suit :
- 10 μL par puits H_2O_{up} pour le blanc
- 10 μL par puits chaque point de la gamme étalon
- 10 μL par puits échantillon d'eau pur et dilué.

Ensuite, 190 μL de réactif de travail BCA sont ajoutés dans chaque puits. Puis incubation de la plaque 30 min à 37^oC à l'étuve. Enfin, lecture de la densité optique (DO) à 540 nm.

Annexe B

Liste des publications et communications scientifiques

B.1 Revues internationales

– M. Marrakchi, F. Lagarde, M-C. Lett, D. Lièvremont, C. Martelet, N. Jaffrezic-Renault, **Feasibility of a conductometric hybrid biosensor using heavy-metal resistant bacterium and glucose oxidase for selenium detection**, Biosensors and Bioelectronics, soumis.

– M. Marrakchi, J. Vidic, N. Jaffrezic-Renault, C. Martelet, E. Pajot, **New olfactory biosensor system based on interdigitated microelectrodes and immobilized yeasts expressing the human receptor OR17-40**, European Biophysics Journal, soumis.

– M. Marrakchi, S.V. Dzyadevych, F. Lagarde, C. Martelet, N. Jaffrezic-Renault, **Conductometric biosensor based on glucose oxidase and beta-galactosidase for specific lactose determination in milk**, Materials Science and Engineering C, accepté.

– M. Marrakchi, S.V. Dzyadevych, Ph. Namour, C. Martelet, N. Jaffrezic-Renault, **An enzyme biosensor based on gold interdigitated thin film electrodes**

for water quality control, Analyticals Letters, accepté.

- M. Marrakchi, S.V. Dzyadevych, O.A. Biloivan, C. Martelet, P. Temple, N. Jaffrezic-Renault, **Development of trypsin biosensor based on ion sensitive field-effect transistors for proteins determination**, Materials Science and Engineering C 26 (2006) 369-373.

- M. Marrakchi, S.V. Dzyadevych, Ph. Namour, C. Martelet, N. Jaffrezic-Renault, **A novel proteinase k biosensor based on interdigitated conductometric electrodes for proteins determination in rivers and sewers water**, Sensors and Actuators B 111-112 (2005) 390-395.

- M.L. Hamlaoui, R. Kherrat, M. Marrakchi, N. Jaffrezic-Renault, A. Walcarius, **Development of an ammonium ISFET sensor with a polymeric membrane including zeolite**, Materials Science and Engineering C 21 (2002) 25-28.

- M.L. Hamlaoui, K. Reybier, M. Marrakchi, N. Jaffrezic-Renault, C. Martelet, R. Kherrat, A. Walcarius, **Development of a urea biosensor based an a polymeric membrane including zeolite**, Analytica Chimica Acta 466 (2002) 39-45.

B.2 Conférences internationales

- M. Marrakchi, F. Lagarde, M-C Lett, D. Lièvremont, C. Martelet, N. Jaffrezic-Renault, **Faisabilité d'un biocapteur hybride utilisant une bactérie résistante aux métaux lourds et la glucose oxydation pour la détection du sélénium**, communication orale, 5èmes journées Maghreb-Europe sur les matériaux et leurs applications aux dispositifs et capteurs, MADICA 2006, Mahdia, Tunisie, 30 octobre - 1er novembre 2006.

- M. Marrakchi, S.V. Dzyadevych, F. Lagarde, C. Martelet, N. Jaffrezic-Renault, **Biocapteur conductimètrique à base de glucose oxydase et béta-galactosidase**

pour le contrôle du lactose dans le lait, poster, 5èmes journées Maghreb-Europe sur les matériaux et leurs applications aux dispositifs et capteurs, MADICA 2006, Mahdia, Tunisie, 30 octobre - 1er novembre 2006.

– M. Marrakchi, S.V. Dzyadevych, Ph. Namour, C. Martelet, N. Jaffrezic-Renault, **A microconductometric biosensor for organic matter control in rivers**, In Proc. of 3rd Black Sea Basin Conference on analytical Chemistry, 3rd BBCAC, page 47, Constanta, Romania, 12-14 September, 2005.

– M. Marrakchi, S.V. Dzyadevych, Ph. Namour, C. Martelet, N. Jaffrezic-Renault, **A novel proteinase k biosensor based on interdigitated conductometric electrodes for proteins determination in rivers and sewers water**, In Proc. of the XVIII Eurosensors 2004, pages 134-135, Rome, Italy, 12-15 September 2004.

– M. Marrakchi, S.V. Dzyadevych, Ph. Namour, C. Martelet, N. Jaffrezic-Renault, **Nouveau biocapteur enzymatique à base d'électrodes interdigitées pour l'analyse des protéines dans les eaux de fleuves**, 4èmes journées Maghreb-Europe sur les matériaux et leurs applications aux dispositifs et capteurs, MADICA 2004, page 136, Gammarth, Tunisie, 29 novembre - 1er décembre 2004.

– M. Marrakchi, S.V. Dzyadevych, C. Martelet, N. Jaffrezic-Renault, **Development of Trypsine biosensor based on ion-sensitive field-effect transistors for proteins determination**, Journées "Edward A.Bouchet International Conference on Physics and high Technology", Hammamet, Tunisie, 11-15 Août 2003.

B.3 Conférences nationales

- M. Marrakchi, F. Lagarde, M-C Lett, D. Lièvremont, C. Martelet, N. Jaffrezic-Renault, **Faisabilité d'un biocapteur conductimétrique hybride utilisant une bactérie résistante aux métaux lourds et de la glucose oxydase pour la détection du sélénium**, communication orale, 19èmes entretiens Jacques Cartier : "Nanobiotechnologies pour l'analyse et la conversion d'énergie", Grenoble, 4-5 décembre 2006.

- M. Marrakchi, S.V. Dzyadevych, Philippe Namour, C. Martelet, N. Jaffrezic-Renault, **Conception d'un biocapteur pour le controle de la pollution urbaine**, ARATEM 2006 : "Destination innovation", Saint Étienne, 9 février 2006.

- M. Marrakchi, S.V. Dzyadevych, Philippe Namour, C. Martelet, N. Jaffrezic-Renault, **Faisabilité d'un biocapteur pour la détection des protéines dans les eaux naturelles**, 12éme édition des Carrefours de la Fondation Rhône Alpes Futur , Lyon, 21 janvier 2005.

- M. Marrakchi, M.L. Hamlaoui, K.Reybier, N. Jaffrezic-Renault, C.Martelet,R. Kherrat, A. Walcarius, **Developpement d'un biocapteur d'urée basé sur une membrane polymérique contenant une zéolite**, 7ème Journée Scientifique de l'EDISS (Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé), Lyon, 16 avril 2003.

Bibliographie

[ABJ+93] Alegret S., Bartrolí J., Jiménez C., Martínez-Fàbregas E., Martorell D., Valdés-Perezgasga F., « ISFET-based urea biosensor », *Sensors and Actuators B*, 16(1-3) :453–457. 1993.

[ADP+06] Anh T.M., Dzyadevych S., Prieur N., Duc C.N., Pham T.D., Jaffrezic-Renault N., Chovelon J.M., « Detection of toxic compounds in real water samples using a conductometric tyrosinase biosensor », *Materials Science and Engineering C*, 26 :453–456. 2006.

[ADS+01] Arkhypova V., Dzyadevych S.V., Soldatkin A., El'skaya A., Jaffrezic-Renault N., Jaffrezic H., Martelet C., « Multibiosensor based on enzyme inhibition analysis for determination of different toxic substances », *Talanta*, 55 :917–927. 2001.

[ADV+04] Anh T., Dzyadevych S., Van M., Jaffrezic-Renault N., Duc C., Chovelon J.M., « Conductometric tyrosinase biosensor for the detection of diuron, atrazine and its main metabolites », *Talanta*, 63 :365–370. 2004.

[AFA97] Amárita F., Fernández C.R., Alkorta F., « Hybrid biosensors to estimate lactose in milk », *Analytica chimica acta*, 349 :153–158. 1997.

[Age03] Agency for Toxic Substances and Disease Registry, « Toxicological Profile For Selenium », Technical report, U.S. Departement Of Health And Human Services, Public Health Service, Atlanta, Georgia. september 2003.

[ASMA00] Albareda-Sirvent M., Merkoçi A., Alegret S., « Configurations used in the design of screen-printed enzymatic biosensors »,

Sensors and Actuators B, 69 :153–163. 2000.

[Auv] Auvray J., « Traitement des signaux », *Techniques de l'ingénieur, traité Mesures et contrôle*, R 305 :1–31.

[BA91] Buck L., Axel R., « A novel multigene family may encode odorant receptors : A molecular basis for odor recognition », *Cell*, 65(1) :175–187. April 1991.

[Ber70] Bergveld P., « Development of an Ion-sensitive Solid State Device for Neurophysiological Measurements », *IEEE Trans, Biomed. Engeneer*, 17 :70–71. 1970.

[Ber03] Bergveld P., « Thirty years of ISFETOLOGY : What happened in the past 30 years and what may happen in the next 30 years », *Sensors and actuators B*, 88 :1–20. 2003.

[BJR98] Bunde R.L., Jarvi E.J., Rosentreter J.J., « Piezoelectric quartz crystal biosensors », *Talanta*, 46 :1223–1236. 1998.

[BKC+06] Boozer C., Kim G., Cong S., Guan H., Londergan T., « Looking towards label-free biomolecular interaction analysis in a high-throughput format : a review of new surface plasmon resonance technologies », *Current opinion in biotechnology*, 17 :400–405. 2006.

[BOL+04] Bae Y.M., Oh B.K., Lee W., Lee W.H., Choi J.W., « Immunosensor for detection of *Legionella pneumophila* based on imaging ellipsometry », *Materials Science and Engineering C*, 24 :61–64. 2004.

[BPS+86] Betzel C., Pal G.P., Struck M., Jany K.D., Saenger W., « Crystallographic study of its complex with dipeptide chloromethyl ketone inhibitor », *FEBS Letters*, 197(1,2) :105–110. 1986.

[Bur00] Burstein C., *Biotechnologie enzymatique : mode d'emploi : industrie alimentaire, environnement, médical*, Paris. 2000.

[BZ05] Bridges C.C., Zalups R.K., « Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals », *Toxicology and Applied Pharmacology*, 204 :274–308. 2005.

[CDCD04] Chouteau C., Dzyadevych S., Chovelon J.M., Durrieu C., « Development of novel conductometric biosensors based on immobilised whole cell *Chlorella vulgaris* microalgae », *Biosensors and Bioelectronics*, 19(9) :1089–1096. 2004.

[CDDC05] Chouteau C., Dzyadevych S., Durrieu C., Chovelon J.M., « A bi-enzymatic whole cell conductometric biosensor for heavy metal ions and pesticides detection in water samples », *Biosensors and Bioelectronics*, 21 :273–281. 2005.

[CFP+06] Capelo J., Fernandez C., Pedras B., Santos P., Gonzalez P., Vaz C., « Trends in selenium determination/speciation by hyphenated techniques based on AAS or AFS », *Talanta*, 68 :1442–1447. 2006.

[CL62] Clark L.C., Lyon C., « Électrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgey », *Ann. NY Acad. Sci.*, 102 :29–45. 1962.

[CLS01] Che Y., Li Y., Slavik M., « Detection of *Campylobacter jejuni* in poultry samples using an enzyme-linked immunoassay coupled with an enzyme electrode », *Biosensors and Bioelectronics*, 16 :791–797. 2001.

[CM04] Coo L.D., Martinez I.S., « Nafion-based optical sensor for the determination of selenium in water samples », *Talanta*, 64 :1317–1322. 2004.

[DAE+01] Dzyadevych S.V., Arkhipova V.N., El'skaya A.V., Martelet C., Jaffrezic-Renault N., « Conductometric enzyme biosensors for substrates or inhibitors analysis », *Current Topics in Analytical Chemistry*, 2 :179–186. 2001.

[DAES06] Dzyadevych S.V., Arkhypova V.N., El'skaya A.V., Soldatkin A.P., « Handbook of Biosensors and Biochips, chapter : Conductometric enzyme biosensor : », To be published. 2006.

[DAS+98] Dzyadevich S.V., Arkhipova V.N., Soldatkin A.P., El'skaya A.V., Shul'ga A.A., « Glucose conductometric biosensor with potassium hexacyanoferrate(III) as an oxidizing agent », *Analytica Chimica Acta*, 374 :11–18. 1998.

[DBF+00] Daunert S., Barrett G., Feliciano J.S., Shetty R.S., Shrestha S., Smith-Spencer W., « Genetically Enineered Whole-Cell Sensing Systems : Coupling Biological Recognition with Reporter Genes », *Chem. Rev.*, 100 :2705–2738. 2000.

[DSC02] Dzyadevych S.V., Soldatkin A.P., Chovelon J.M., « Assenssment of the toxicity of methyl parathion and its photodegradation products in water samples using conductometric enzyme biosensors », *Analytica Chimica Acta*, 459 :33–41. 2002.

[DSE+06] Dzyadevych S.V., Soldatkin A.P., El'skaya A.V., Martelet C., Jaffrezic-Renault N., « Enzyme biosensors based on ion-selective field-effect transistors », *Analytica Chimica Acta*, 5 :248–258. 2006.

[DSP+94] Dzyadevich S.V., Shul'ga A.A., Patskovskii S.V., Arkhipova V.N., Soldatkin A.P., Strikha V.I., « Thin-Film conductimetric sensors for enzyme biotransducers », *Russian Journal of Electrochemistry*, 30(8) :982–987. 1994.

[DSS+94] Dzyadevich S.V., Shul'ga A.A., Soldatkin A.P., Hendji A.M.N., Jaffrezic-Renault N., Martelet C., « Conductometric biosensors based on cholinesterases for sensitive detection of pesticides », *Electroanalysis*, 6 :752–758. 1994.

[DW94] D.R. Walt V.I.A., « The chemistry of enzyme and protein immobilization with glutaraldehyde », *Trends in analytical chemistry*, 13(10) :425–430. 1994.

[DZL04] Deng C., Zhang X., Li N., « Investigation of volatile biomarkers in lung cancer blood using solid-phase microextraction and capillary gas chromatography-mass spectrometry », *Journal of chromatography B*, 808 :269–277. 2004.

[Dzy92] Dzyadevich S.V., « Elaboration of thin-film conductometric biosensors », Diploma work, Laboratoire de physicochimie des interfaces ; Ecole Centrale de Lyon, France. 1992.

[EHK+74] Ebeling W., Hennrich N., Klockow M., Metz H., Orth H.D., Lang H., « Proteinase K from *Tritirachium album* Limber », *European Journal of Biochemistry*, 47 :91–97. 1974.

[Fer97] Ferrigno R., *Électrodes interdigitées de puissance*, Thèse de doctorat, École polytechnique fédérale de Lausanne. 1997.

[FIM+05] Funabashi H., Ishikawa M., Mie M., Takahashi F., Yanagida Y., Aizawa M., Kobatake E., « Electrochemical evaluation od

cellular physiological status under stress in *Escherichia coli* with the *rpoS-lacZ* reporter gene », *Biotech. Bioengin.*, 90 :509–515. 2005.

[FRN+05] Fernandes C., Rainey F., Nobre M.F., Pinhal I., Folhas F., Costa M.D., « Herminiimonas fonticola gen. nov., sp. nov., a Betaproteobacterium isolated from a source of bottled mineral water », *Syst Appl Microbiol*, 28 :596–603. 2005.

[GCE+06] Gomila G., Casuso I., Errachid A., Ruiz O., Pajot E., Minic J., Gorojankina T., Persuy M., Aioun J., Salesse R., Bausells J., Villanueva G., Rius G., Hou Y., Jaffrezic N., Pennetta C., Alfinito E., Akimov V., Reggiani L., Ferrari G., Fumagalli L., Sampietro M., Samitier J., « Advances in the production, immobilization, and electrical characterization of olfactory receptors for olfactory nanobiosensor development », *Sensors and Actuators B*, 116 :66–71. 2006.

[GCM+99] Gehring A.G., Crawford C.G., Mazenko R.S., Houten L.J.V., Brewster J.D., « Enzyme-linked immunomagnetic electrochemical detection of *Salmonella typhimurium* », *Journal of Immunological Methods*, 195(1-2) :15–25. 1999.

[GdON85] Guilbaut G.G., de Olivera Neto G., *Immobilised Cells and enzymes : a practical approch*, chapitre Immobilised Enzymes, pp. 55–74, IRL Press. 1985.

[GMZ04] Guan J.G., Miao Y.Q., Zhang Q.J., « Impedimetric Biosensors », *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 97(4) :219–226. 2004.

[GNLSR06] González-Nieto J., López-Sánchez J., Rubio R., « Comparaison of chemical modifiers for selenium determination in soil aqua regia extracts by ZETAAS », *Talanta*, 69 :1118–1122. 2006.

[GSP+97] Gorchkov D., Soldatkin A., Poyard S., Jaffrezic-Renault N., Martelet C., « Application of charged polymeric materials as additional permselective membranes for improvement of the performance characteristics of urea-sensitive enzymatic field effect transistors 1. Determination of urea in model solutions », *Materials Science and Engineering C*, 5(1) :23–28. 1997.

[HHZ+06] Hou Y., Helali S., Zhang A., Jaffrezic-Renault N., Martelet C., Minic J., Gorojankina T., Persuy M.A., Pajot-Augy E., Salesse R., al., « Immobilization of rhodopsin on a self-assembled multilayer and its specific detection by electrochemical impedance spectroscopy », *Biosensors and Bioelectronics*, 21(7) :1393–1402. 2006.

[HJRM+07] Hou Y., Jaffrezic-Renault N., Martelet C., Zhang A., Minic-Vidic J., Gorojankina T., Persuy M.A., Pajot-Augy E., Salesse R., Akimov V., al., « A novel detection strategy for odorant molecules based on controlled bioengineering of rat olfactory receptor I7 », *Biosensors and Bioelectronics*, 22 :1393–1402. 2007.

[HKM+02] Hamlaoui M.L., Kherrat R., Marrakchi M., Jaffrezic-Renault N., Walcarius A., « Development of an ammonium ISFET sensor with a polymeric membrane including zeolite », *Materials Science and Engineering C*, 21 :25–28. 2002.

[Hle05] Hleli S., « Etude par Spectroscopie d'Impédance Electrochimique des propriétés électriques d'une monocouche mixte auto-assemblée pour application : Biocapteur », in *Conférence des jeunes chercheurs*, Montpellier, France. 2005.

[HMA+06a] Hleli S., Martelet C., Abdelghani A., Bessueille F., Errachid A., Samitier J., Hays H., Millner P., Burais N., Jaffrezic-Renault N., « An immunosensor for haemoglobin based on impedimetric properties of a new mixed self-assembled monolayer », *Materials Science and Engineering : C*, 26(2-3) :322–327. Mars 2006.

[HMA+06b] Hleli S., Martelet C., Abdelghani A., Burais N., Jaffrezic-Renault N., « Atrazine analysis using an impedimetric immunosensor based on mixed biotinylated self-assembled monolayer », *Sensors and Actuators B : Chemical*, 113(2) :711–717. Février 2006.

[Hol97] Holley A., « Le physiologiste et la catégorisation des odeurs », *Intellectica*, 24(1) :21–27. 1997.

[Hou05] Hou Y., *Élaboration et caractérisation de biofilms pour micro- et nanobiocapteurs olfactifs*, Thèse de doctorat, École centrale de Lyon. 2005.

[HRM+02] Hamlaoui M.L., Reybier K., Marrakchi M., Jaffrezic-Renault N., Martelet C., Kherrat R., Walcarius A., « Development of a urea biosensor based on a polymeric membrane including zeolite », *Analytica Chimica Acta*, 466 :39–45. 2002.

[Jac05] Jacquier V., *Functional characterization of a human odorant receptor*, Thèse de doctorat, Ecole polytechnique fédérale de Lausanne. 2005.

[JM85] Jany K.D., Mayer B., « Proteinase K from *Tritirachium album* Limber », *Bio. Chem. Hoppe-Seyler*, 266 :485–492. 1985.

[JRMC] Jaffrézic-Renault N., Martelet C., Clechet P., « Capteurs chimiques et biochimiques », *Techniques de l'ingénieur, traité Analyse et Caractérisation, Mesures et Contrôle*, PE 360 - R 420 :1–21.

[Kau02] Kauffmann J.M., « Les biocapteurs dans le domaine pharmaceutique », *Ann Pharm Fr*, 60 :28–37. 2002.

[KF76] Kraus E., Femfert U., « Proteinase K from the Mold *Tritirachium album* Limber : Specificity and mode of action », *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 357 :937–947. 1976.

[KK99] Kambhampati D.K., Knoll W., « Surface-plasmon optical techniques », *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 4 :273–280. 1999.

[KP05] Ko H.J., Park T.H., « Piezoelectric olfactory biosensor : ligand specificity and dose-dependence of an olfactory receptor expressed in a heterologous cell system », *Biosensors and Bioelectronics*, 20 :1327–1332. 2005.

[KPA+06] Kurosawa S., Park J.W., Aizawa H., Wakida S.I., Tao H., Ishihara K., « Quartz crystal microbalance immunosensors for environmental monitoring », *Biosensors and Bioelectronics*, in press. 2006.

[KPK06] Kima N., Park I.S., Kim W.Y., « *Salmonella* detection with a direct-binding optical grating coupler immunosensor », *Sensors and Actuators B : Chemical*, in press. 2006.

[KYR98] Krautwurst D., Yau K.W., Reed R.R., « Identification of Ligands for Olfactory Receptors by Functional Expression of a Receptor Library », *Cell*, 95 :917–926. 1998.

[LCM06] Lei Y., Chen W., Mulchandani A., « Microbial biosensors », *Analytica Chimica Acta*, 568(1-2) :200–210. 2006.

[LdB00] Lange B., den Berg C.V., « Determination of selenium by catalytic cathodic stripping voltametry », *Anal. Chim. Acta*, 418 :33–42. 2000.

[LDY+05] Li N., Deng C., Yin X., Yao N., Shen X., Zhang X., « Gas chromatography-mass spectrometric analysis of hexanal and heptanal in human blood by headspace single-drop microextraction with droplet derivatization », *Analytical Biochemistry*, 342 :318–326. 2005.

[LGC97] Llorente I., Gómez M., Cámara C., « Improvement of selenium determination in water by inductively coupled plasma mass spectrometry through use of organic compounds as matrix modifiers », *Spectrochimica Acta, Part B*, 52 :1825–1838. 1997.

[LHJT90] Lorenzo V.D., Herrero M., Jakubzik U., Timmis K.N., « Mini-Tn5 Transposon Derivatives for insertion Mutagenesis, Promoter Probing, and Chromosomal Insertion of cloned DNA in Gram-Negative Eubacteria », *J. Bacteriol.*, 172 :6568–6572. 1990.

[LKK+00] Lee W.Y., Kim S.R., Kim T.H., Lee K.S., Shin M.C., Park J.K., « Sol-gel-derived thick-film conductometric biosensor for urea determination in serum », *Analytica Chimica Acta*, 404 :195–203. 2000.

[LLY+98] Liu H., Li H., Ying T., Sun K., Qin Y., Qi D., « Amperometric biosensor sensitive to glucose and lactose based on co-immobilization of ferrocene, glucose oxidase, β-galactosidase and mutarotase in β-cyclodextrin polymer », *Analytica chimica acta*, 358 :137–144. 1998.

[LNBL03] Lièvremont D., N'negue M.A., Behra P., Lett M.C., « Biological oxidation of arsenite : batch reactor experiments in presence of kutnahorite and chabazite », *Chemosphere*, 51 :419–428. 2003.

[LPG+03] Levasseur G., Persuy M.A., Grebert D., Remy J.J., Salesse R., Pajot-Augy E., « Ligand-specific dose-response of heterologously expressed olfactory receptors », *Eur. J. Biochem.*, 270 :2905–2912. 2003.

[LSC01] Luppa P.B., Sokoll L.J., Chan D.W., « Immunosensors principles and applications to clinical chemistry », *Clinica chimica acta*, 314 :1–26. 2001.

[LYS+97] Liu H., Ying T., Sun K., Li H., Qi D., « Reagentless amperometric biosensors highly sensitive to hydrogen peroxide, glucose and lactose based on N-methyl phenazine methosulfate incorporated in a Nafion film as an electron transfer mediator between horseradish peroxidase and an electrode », *Analytica chimica acta*, 344 :187–199. 1997.

[LZF+99] Li Y., Zhoua Y., Fenga J., Jiangb Z., Ma L., « Immobilization of enzyme on screen-printed electrode by exposure to glutaraldehyde vapour for the construction of amperometric acetylcholinesterase electrodes », *Analytica Chimica Acta*, 382 :277–282. 1999.

[MA04] Mehrvar M., Abidi M., « Recent Developments, characteristics, and potential applications of electrochemical biosensors », *Analytical sciences*, 20 :1113–1126. August 2004.

[Mai04] Mai A.T., *Développement des biocapteurs électrochimiques à base de tyrosinase pour la détection des polluants organiques en phase aqueuse*, Thèse de doctorat, Université Claude Bernard Lyon 1. 2004.

[MB06] Marquette C.A., Blum L.J., « State of the art and recent advances in immunoanalytical systems », *Biosensors and Bioelectronics*, 21 :1424–1433. 2006.

[MBMGSM06] Montes-Bayón M., Molet M., González E., Sanz-Medel A., « Evaluation of different sample extraction strategies for selenium determination in selenium-enriched plants (*Allium sativum* and *Brassica*

juncea) and Se speciation by HPLC-IPC-MS », *Talanta*, 68 :1287–1293. 2006.

[MDB+06] Marrakchi M., Dzyadevych S., Biloivan O., Martelet C., Temple P., Jaffrezic-Renault N., « Development of trypsin biosensor based on ion sensitive field-effect transistors for proteins determination », *Materials Science and Engineering : C*, 26(2-3) :369–373. 2006.

[MDN+05] Marrakchi M., Dzyadevych S., Namour P., Martelet C., Jaffrezic-Renault N., « A novel proteinase K biosensor based on interdigitated conductometric electrodes for proteins determination in rivers and sewers water », *Sensors and Actuators B*, 111-112 :390–395. 2005.

[Min91] Minh C.T., *Les biocapteurs : principes, construction et applications*, Masson. 1991.

[MKND05] Maestre E., Katakis I., Narváez A., Dominguez E., « A multianalyte flow electrochemical cell : application to the simultaneous determination of carbohydrates based on bioelectrocatalytic detection », *Biosensors and Bioelectronics*, 21 :774–781. 2005.

[MLS+03] Muller D., Lièvremont D., Simeonova D.D., Hubert J.C., Lett M.C., « Arsenite Oxidase *aox* Genes from a Metal-Resistant β-Proteobacterium », *J. Bacteriol.*, 185 :135–141. 2003.

[Mor96] Morf W.E., « Theoretical treatment of the amperometric current response of multiple microelectrode arrays », *Electroanalytical chemistry and sensor*, 330(2-3) :139–149. 1996.

[MPG+05] Minic J., Persuy M.A., Godel E., Aioun J., Connerton I., Salesse R., Pajot-Augy E., « Functional expression of olfactory receptors in yeast and development of a bioassay for odorant screening », *FEBS Journal*, 272 :524–537. 2005.

[MSR+06] Muller D., Simeonova D., Riegel P., Mangenot S., Koechler S., Lièvremont D., Bertin P.N., Lett M.C., « Herminiimonas arsenicoxydans sp. nov., a metalloresistant bacterium », *Syst Appl Microbiol*, in press. 2006.

[MSSPA05] Minic J., Sautel M., Salesse R., Pajot-Augy E., « Yeast system as a screening tool for pharmacological assessment of G protein coupled receptors », *Current medicinal chemistry*, 12 :763–771. 2005.

[Nam99] Namour P., *Auto-épuration des rejets organique domestiques. Nature de la matière organique résiduaire et son effet en rivière*, Thèse de doctorat, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon. 1999.

[Nie99] Nies D.H., « Microbial heavy-metal resistance », *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 51 :730–750. 1999.

[PF01] Palecek E., Fojta M., « DNA hybridisation and damage », *Analytical chemistry*, 2 :75. 2001.

[PM06] Pejcic B., Marco R.D., « Impedance spectroscopy : over 35 years of electrochemical sensor optimization », *Electrochimica acta*, 51 :6217–6229. 2006.

[PPH01] Pak S.C., Penrose W., Hesketh P.J., « An ultrathin platinum film sensor to measure biomolecular binding », *Biosensors and Bioelectronics*, 16 :371–379. 2001.

[RLW06] Reash R.J., Lohner T., Wood K.V., « Selenium and other trace metals in fish inhabiting a fly ash stream : Implications for regulatory tissue thresholds », *Environmental Pollution*, 142 :397–408. 2006.

[RSL+04] Reid M.E., Stratton M.S., Lillico A.J., Fakih M., Natarajan R., Clark L.C., Marshall J.R., « A report of high-dose seleniul supplementation : response and toxicities », *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 18 :69–74. 2004.

[RW98] Reilander H., Weib H.M., « Production of G-protein-coupled receptors in yeast », *Current Opinion in Biotechnology*, 9 :510–517. 1998.

[Sar00] Sarkar P., « One-step separation-free amperometric biosensor for the detection of protein », *Microchem. Journ.*, 64 :283–290. 2000.

[SEJ+94] Soldatkin A.P., El'skaya A.V., Jdanova A.A.S.A.S., Dzyadevich S.V., Jaffrezic-Renault N., Martelet C., Clechet

P., « Glucose sensitive conductometric biosensor with additional Nafion membrane : reduction of influence of buffer capacity on the sensor response and extension of its dynamic range », *Analytica Chimica Acta*, 288 :197–203. 1994.

[SHS+05] Schmidt A., Haferburg G., Sineriz M., Merten D., Büchel G., Kothe E., « Heavy metal resistance mechanisms in actinobacteria for survival in AMD contaminated soils », *Chimie der Erde*, 65(1) :131–144. 2005.

[Sil98] Silver S., « Genes for all metals-abacterial view of the Periodic Table The 1996 Thom Award Lecture », *J. Ind. Microbiol. Biotech.*, 20 :1–12. 1998.

[SJRMC99] Senillou A., Jaffrezic-Renault N., Martelet C., Cosnier S., « A miniaturized urea sensor based on the integration of both ammonium based urea enzyme field effect transistor and a reference field effect transistor in a single chip », *Talanta*, 50 :219–226. 1999.

[SK01] Saritha K., Kumar N.N., « Qualitative detection of selenium in fortified soil and water samples by a paper chromatographic-carboxyl esterase enzyme inhibition technique », *Journal of Chromatography A*, 919 :223–228. 2001.

[SKH+85] Smith P., Krohn R., Hermanson G., Mallia A., Gartner F., Provenzano M., Fujimoto E., Goeke N., Olson B., Klenk C., « Measurement of protein using bicinchoninic acid », *Anal. Biochem.*, 150 :76–85. 1985.

[SKP06] Sung J.H., Ko H.J., Park T.H., « Piezoelectric biosensor using olfactory receptor protein expressed in *Escherichia coli* », *Biosensors and Bioelectronics*, 21 :1981–1986. 2006.

[SLB95] Scouton W.H., Luong J.T., Brown R.S., « Enzyme or protein immobilization techniques for application in biosensor design », *Trends in Biotechnology*, 13 :178–184. 1995.

[SLFC03] Semenova N., Leal L., Forteza R., Cerdà V., « Multisyringe flow injection system for total inorganic selenium determination by hybride generation-atomic fluorescence spectrometry », *Analytica Chimica Acta*, 486 :217–225. 2003.

[SO99] Stolz J.F., Oremland R.S., « Bacterial respiration of arsenic and selenium », *FEMS Microbiol. Rev.*, 23 :615–627. 1999.

[SSH+99] Spanel P., Smith D., Holland T.A., Singary W.A., Elder J.B., « Analysis of formaldehyde in the headspace of urine from bladder and prostate cancer patients using selected ion flow tube mass spectrometry », *Rapid communications in mass spectrometry*, 13 :1354–1359. 1999.

[SSM+04] Sharma S.K., Singhal R., Malhotra B., Sehgal N., Kumar A., « Lactose biosensor based on Langmuir-Blodgett films of poly(3-hexyl thiophene) », *Biosensors and Bioelectronics*, 20 :651–657. 2004.

[SSS+00] Schutz S., Schoning M., Schroth P., Malkoc U., Weissbecker B., Kordos P., Luth H., Hummel H., « An insect-based BioFET as a bioelectronic nose », *Sensors and Actuators B*, 65 :291–295. 2000.

[SWWL01] Scheller F.W., Wollenberger U., Warsinke A., Lisdat F., « Research and development in biosensors », *Current Opinion in Biotechnology*, 12 :35–40. 2001.

[Tin03] Tinggi U., « Essentiality and toxicity of selenium and its status in Australia : a review », *Toxicology Letters*, 137 :103–110. 2003.

[TL96] Tamas-Lhoustau S., « Les biocapteurs, mesure en temps réel de l'intéraction entre biomolécules », *Le technoscope de biofutur*, 159 :3–15. Septembre 1996.

[TT87] Tampion J., Tampion M.D., *Immobilized cells : principles and applications*, Press Syndicate of the University of Cambridge. 1987.

[TTDW01] Thévenot D.R., Toth K., Durst R.A., Wilson G.S., « Electrochemical biosensors : recommended definitions and classification », *Biosensors and Bioelectronics*, 16 :121–131. 2001.

[Tur05] Turner A.P.F., « Biosensors and Bioelectronics 20 years on », *Biosensors and Bioelectronics*, 20 :2387–2387. 2005.

[TvdM06] Tecon R., van der Meer J.R., « Information from single-cell bacterial biosensors : what is it good for ? », *Curr. Opin. Biotechnol.*, 17 :4–10. 2006.

[TXW05] Tang X., Xu Z., Wang J., « A hybride generation atomic fluorescence spectrometric pocedure for selenium determination after flow injection on-line co-precipitate preconcentration », *Spectrochimica Acta, Part B*, 60 :1580–1585. 2005.

[TZW+02] Tan J., Zhu W., Wang W., Li R., Hou S., Wang D., Yang L., « Selenium in soil and endemic diseases in China », *The Science of the Total Environment*, 284 :227–235. 2002.

[UH67] Updike S.J., Hicks G., « The enzyme electrode », *Nature*, 214 :986–988. 1967.

[VDB+01] Vassileva E., Docekalová H., Baeten H., Vanhentenrijk S., Hoenig M., « Revisitation of mineralization modes for arsenic and selenium determinations in environmental samples », *Talanta*, 54 :187–196. 2001.

[WLP+99] Weeger W., Lièvremont D., Perret M., Lagarde F., Hubert J.C., Leroy M., Lett M.C., « Oxidation of arsenite to arsenate by a bacterium isolated from an aquatic environment », *Biometals*, 12 :141–149. 1999.

[Woo85] Woodward J., *Immobilised Cells and enzymes : a practical approch*, chapitre Immobilised Enzymes : Adsorption and covalent coupling, pp. 3–17, IRL Press. 1985.

[WOW+99] Wetzel C.H., Oles M., Wellerdieck C., Kuczkowiak M., Gisselmann G., Hatt H., « Specificity and sensitivity of a human olfactory receptor functionally expressed in human embryonic kidney 293 cells and *Xenopus Laevis* Oocytes », *The journal of neuroscience*, 19(17) :7426–7433. 1999.

[Wu99] Wu T.Z., « A piezoelectric biosensor as an olfactory receptor for odour detection : electronic nose », *Biosensors and Bioelectronics*, 14 :9–18. 1999.

[ZEN91] Zozulya S., Echeverri S., Nguyen T., « The human olfactory receptor repertoire », *Genome Biology*, 2(6) :1–12. 1991.

Liste des figures

1.1 Pluridisciplinarité du domaine des biocapteurs 8

1.2 Représentation schématique d'un biocapteur 9

1.3 Représentation schématique des transistors MOSFET et ISFET . . . 16

1.4 A gauche : photo au microscope électronique de la zéolithe ; A droite : schéma de la structure spatiale de la zéolithe 16

1.5 Photo du transducteur ISFET avec vue au microscope optique de la partie sensible avec la membrane enzymatique déposée 17

1.6 Représentation schématique des différents biorécepteurs 23

1.7 Schéma explicatif du mécanisme moléculaire impliqué lors de l'hydrolyse protéique catalysée par les protéases à sérine 29

1.8 Représentation schématique du fonctionnement d'un biocapteur enzymatique 30

1.9 (a) Détermination des constantes michaeliennes (b) Représentation en double inverse de Lineweaver et Burek 33

1.10 Représentation schématique des différentes méthodes d'immobilisation de l'élément biologique 36

1.11 Les structures de GA dans une solution acqueuse 38

1.12 Les réactions de différentes formes de GA avec les enzymes 39

2.1 Migration des ions dans la solution et conductivité de l'électrolyte . . 44

2.2 Photo des bandes interdigitées prise en microscopie optique 46

2.3 Les Électrodes interdigitées 47
2.4 Photo du capteur conductimètrique en platine 48
2.5 Vue générale des microélectrodes interdigitées en Or 48
2.6 Modèle de circuit équivalent de l'impédance d'interface 51
2.7 Modèle de circuit équivalent des électrodes interdigitées 51
2.8 Diagramme d'impédance du montage conductimètrique 52
2.9 Montage de la mesure conductimètrique 54
2.10 Photo du lock-in Amplifier SR 510 55
2.11 Vue Générale du dispositif de mesure conductimétrique 55

3.1 Représentation schématique de l'hydrolyse catalysée par la protéinase K 61
3.2 Effet du temps d'exposition à la vapeur de glutaraldéhyde sur la réponse du biocapteur 62
3.3 Effets du sel (a) et de la température (b), sur le réponse du biocapteur 63
3.4 Étude de la stabilité du biocapteur au cours du temps 64
3.5 (a) Réponse typique en fonction du temps du biocapteur à protéines (b) Courbe de calibrage du biocapteur en fonction de la concentration de BSA 65
3.6 Etude de la reproductibilité du biocapteur 65
3.7 (a) Test de l'effet de l'eau sur la réponse du biocapteur (b) Comparaison de la réponse du biocapteur avec les valeurs données par la microBCA 66
3.8 Courbe de calibration de la BSA avec les électrodes interdigitées en or 68
3.9 Comparaison de la réponse du biocapteur avec les valeurs de COD . . 69
3.10 Comparaison de la réponse du biocapteur avec les valeurs données par la microBCA 70

4.1 Réactions enzymatiques catalysées par la β-galactosidase et la glucose oxydase 77

4.2 Représentation schématique des étapes d'immobilisation des deux enzymes sur le transducteur 78

4.3 Réponse typique en fonction du temps du biocapteur après ajout du lactose 79

4.4 (a) Réponse du biocapteur en fonction de la concentration de lactose (b) Gamme linéaire de calibration du lactose 80

4.5 Évolution de la réponse du biocapteur au cours du temps 80

4.6 Réponse en fonction du temps pour le lactose et le glucose (a) du biocapteur sans la Gox dans la membrane de référence (b) du biocapteur avec la Gox dans la membrane de référence 81

4.7 Détermination de la concentration de lactose dans des échantillons de laits commerciaux 82

5.1 Photo de l'appareil incubateur-agitateur utilisé pour la culture bactérienne 91

5.2 Représentation schématique des différentes étapes de la procédure d'immobilisation de la GOD et de la bactérie 92

5.3 Image de l'électrode de travail observée au MEB 93

5.4 Réponse typique du biocapteur en fonction du temps après ajout du lactose 94

5.5 Courbe de calibration du lactose avec le biocapteur incubé pendant 90 heures en présence de 0,5 mM de sélénite 95

5.6 Comparison des réponses du biocapteur témoin avec le biocapteur incubé en présence de différentes concentrations de Se 95

5.7 Détermination de la concentration de lactose à ajouter pour une sensibilité optimale du biocapteur 96

5.8 Comparaison des réponses du biocapteurs selon le mode d'exposition au sélénite 97

5.9 Courbe de calibrage par la méthode de pré-exposition pour la détermination du sélénite 98

6.1 Représentation schématique d'une coupe d'épithélium olfactif de vertébré106

6.2 Schéma représentatif de la structure des récepteurs couplés aux protéines-G 107

6.3 Cycle d'activation des récepteurs couplés aux protéines-G 109

6.4 Les mécanismes de transduction du signal olfactif 110

6.5 Structure chimique de l'hélional 111

6.6 Structure chimique de la polylysine 113

6.7 Optimisation de l'immobilisation avec la polylysine 114

6.8 Cinétique de la réponse du biocapteur avec les levures exprimant le récepteur OR 17-40 115

6.9 Réponse en fonction de la concentration d'odorant 116

6.10 Étude de la répétitivité des mesures du biocapteur pour la détection de l'odorant 117

6.11 Sélectivité du biocapteur pour l'odorant spécifique du récepteur olfactif humain OR17-40 118

Liste des tableaux

1.1 Les transducteurs électrochimiques et les méthodes de mesure correspondantes 12

1.2 Données sur le développement de différents biocapteurs conductimètriques 19

1.3 Quelques exemples de biocapteurs à base de microorganismes 35

Table des matières

Remerciements **iii**

Résumé **vii**

Introduction générale **1**

1 Les biocapteurs **7**

1.1 Généralités 7

1.1.1 Introduction 7

1.1.2 Définition 9

1.1.3 Historique 9

1.1.4 Classification des biocapteurs 10

1.1.5 Caractéristiques des biocapteurs 10

1.2 Les transducteurs 11

1.2.1 Les transducteurs électrochimiques 11

1.2.1.1 Les transducteurs ampéromètriques 11

1.2.1.2 Les transducteurs impédancemétriques (ou impédimétriques) 13

1.2.1.3 Les transducteurs potentiométriques 14

1.2.1.4 Les transducteurs conductimétriques 18

1.2.2 Les transducteurs optiques 19

1.2.3 Les transducteurs piézoélectriques 21
1.2.4 Les transducteurs thermiques 22
1.3 Les biorécepteurs 22
1.3.1 Les anticorps 23
1.3.2 Les récepteurs 24
1.3.3 Les acides nucléiques 25
1.3.4 Les cellules animales et végétales 26
1.3.5 Les tissus végétaux ou animaux 26
1.3.6 Les enzymes 26
1.3.6.1 Les protéases 27
1.3.6.2 La protéinase K 30
1.3.6.3 Capteurs enzymatiques 30
1.3.6.4 Influence du pH 33
1.3.6.5 Influence de la température 34
1.3.7 Les microorganismes 34
1.4 Les méthodes d'immobilisation 36
1.4.1 Emprisonnement physique 36
1.4.2 Adsorption 37
1.4.3 Liaison covalente 37
1.4.4 Réticulation 37
1.4.4.1 La réticulation au glutaraldéhyde 38
1.5 Conclusion 40

2 Les microélectrodes interdigitées et les mesures conductimètriques 43
2.1 Introduction 43
2.2 Principe Général 44

2.3 Les microélectrodes 46
2.3.1 Fabrication 46
2.3.2 Les microélectrodes utilisées 47
2.3.2.1 Les microélectrodes interdigitées en platine 47
2.3.2.2 Les microélectrodes interdigitées en Or 48
2.3.3 Nettoyage des électrodes 49
2.4 Caractérisation des électrodes interdigitées 49
2.4.1 L'impédance à l'interface 49
2.4.2 Model de circuit équivalent des électrodes interdigitées 51
2.5 Déroulement des mesures avec les microélectrodes 53
2.5.1 Montage expérimental des mesures conductimètriques 53
2.5.2 Conditions de mesure 56
2.6 Conclusions 56

3 Développement d'un biocapteur conductimétrique pour le dosage des protéines dans les eaux naturelles 59

3.1 Introduction 59
3.2 Matériels et méthodes 60
3.2.1 Matériels 60
3.2.2 Immobilisation de l'enzyme 60
3.2.3 Stockage 61
3.2.4 Préparation des échantillons d'eaux naturelles 61
3.3 Développement et optimisation du biocapteur 62
3.3.1 Conditions optimales 62
3.3.2 Caractéristiques analytiques du biocapteur obtenu 64
3.3.3 Tests préliminaires sur des échantillons d'eau 66

3.4 Application du biocapteur à protéinase K immobilisée au contrôle de la qualité de l'eau 67
3.4.1 Vérification des caractéristiques du biocapteur 67
3.4.2 Application à l'analyse des eaux de rivières 68
3.4.2.1 Comparaison avec le carbone organique total (COD) 69
3.4.2.2 Comparaison avec la concentration en protéines totales déterminée par la méthode classique microBCA 69
3.5 Conclusions et perspectives 70

4 Développement d'un biocapteur conductimètrique pour le dosage du lactose dans le lait 75

4.1 Contexte 75
4.2 Introduction 76
4.3 Matériels et méthodes 76
4.3.1 Matériels 76
4.3.2 Immobilisation des enzymes 77
4.3.3 Stockage 78
4.3.4 Préparation des échantillons de lait 78
4.4 Résultats et discussion 79
4.4.1 Dosage du lactose 79
4.4.2 Étude de la stabilité du biocapteur 80
4.4.3 Étude des éventuelles interférences avec le glucose 81
4.4.4 Dosage du lactose dans le lait 82
4.5 Conclusions et perspectives 83

5 Développement d'un biocapteur conductimètrique hybride à base de bactérie mutante et de glucose oxydase pour la détection du sélénite 87

5.1 Contexte et motivations 87

5.2 Matériels et méthodes 89
5.2.1 Réactifs utilisés 89
5.2.2 Caractéristiques de la souche bactérienne 90
5.2.3 Culture bactérienne 91
5.2.4 Immobilisation des enzymes puis des bactéries 92
5.2.5 Exposition des bactéries au sélenium 93
5.3 Résultats et discussion 94
5.3.1 Tests préliminaires et études des caractéristiques analytiques du biocapteur 94
5.3.2 Effets de la concentration en lactose utilisée sur la sensibilité du biocapteur 96
5.3.3 Comparaison des réponses du biocapteur obtenues selon le mode d'exposition au sélénium adopté 97
5.3.4 Dosage du sélénite après optimisation 98
5.4 Conclusions et perspectives 99

6 Faisabilité d'un biocapteur olfactif à base de levures exprimant le récepteur humain OR17-40 103

6.1 Introduction 103
6.2 Contexte et motivations 104
6.3 Les récepteurs olfactifs et la perception de l'odeur 105
6.3.1 Présentation générale du système olfactif 105
6.3.2 Structure des récepteurs olfactifs 107
6.3.3 Activation des récepteurs couplés aux protéines G et la transmission du signal 108
6.3.4 Mécanismes moléculaires de la transduction et de la régulation du signal olfactif 109
6.3.5 Le récepteur OR17-40 110

6.4 Matériels et méthodes 111
6.4.1 Produits 111
6.4.2 Préparation des milieux de Culture 112
6.4.3 Culture des levures 112
6.4.4 Immobilisation des levures 113
6.4.5 Préparation des solutions d'odorant 114
6.5 Résultats et discussion 114
6.5.1 Optimisation de l'immobilisation 114
6.5.2 Détection de l'hélional par le biocapteur olfactif 115
6.5.2.1 Réponse en fonction du temps 115
6.5.2.2 Réponse en fonction de la dose d'odorant 116
6.5.2.3 Étude de la répétitivité des réponses 117
6.6 Conclusions et perspectives 118

Conclusion générale et perspectives **121**

Annexes **124**

A Dosage des protéines par la méthode BCA (BCA Protein Assay Kit) **125**

B Liste des publications et communications scientifiques **127**
B.1 Revues internationales 127
B.2 Conférences internationales 128
B.3 Conférences nationales 130

Bibliographie **131**

Liste des figures **148**

Liste des tableaux **149**

Table des matières **157**